



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
Ano 2013

**ANA RAQUEL COSTA
ALMEIDA**

**INDUÇÃO DE EMBRIOGÉNESE SOMÁTICA EM
PINUS ELLIOTTII E NUM HÍBRIDO**



**ANA RAQUEL COSTA
ALMEIDA**

**INDUÇÃO DE EMBRIOGÉNESE SOMÁTICA EM
PINUS ELLIOTTII E O HÍBRIDO**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizado sob a orientação científica da Doutora Glória Catarina Cintra da Costa Pinto, Investigadora Auxiliar do CESAM, coorientação da Professora Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro/CESAM e Doutora Maria Celeste Pereira Dias, Investigadora em Pós-Doutoramento do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro/CESAM.

o júri

presidente

Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira
Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

arguente principal

Doutora Sandra Isabel Marques Correia
Investigadora, KLÓN, Biocant, Cantanhede, Portugal

orientadora

Doutora Glória Catarina Cintra da Costa Pinto
Investigadora auxiliar do CESAM da Universidade de Aveiro

co-orientadora

Doutora Maria Celeste Pereira Dias
Investigadora em pós-doutoramento do CESAM da Universidade de Aveiro

co-orientadora

Professora Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos
Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro/CESAM

palavras-chave

Indução *calli*, stresse físico, stresse químico

resumo

Dada a importância comercial de *Pinus elliottii* e do híbrido *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea*, e a necessidade de desenvolver uma bateria de protocolos de cultura *in vitro* para aplicação em programas de (micro) propagação e em programas de investigação em geral (eg, fisiologia, biologia molecular, etc), estabeleceu-se como objetivo principal estudar o efeito de vários fatores (endógenos e exógenos) na indução de: a) tecido caloso (importante em estudos fundamentais de fisiologia, manutenção de germoplasma, morfogénese, etc); b) tecido caloso embriogénico (importante para a regeneração de plantas por ES, estudos de criopreservação, etc). Neste sentido, embriões zigóticos maduros (EZM) e cotilédones foram sujeitos a diferentes concentrações de reguladores de crescimento (2 mg/L de 2,4-D; 2 mg/L de NAA e 0,02 mg/L de TDZ). Os primeiros sinais de *callus* surgiram ao fim de 15 dias. A concentração de reguladores de crescimento mais eficiente em EZM foi 2 mg/L de 2,4-D com uma taxa de indução de *calli* de 85% e em cotilédones foi 2 mg/L de 2,4-D com 55% de indução de *calli*. EZM foram sujeitos a diferentes concentrações de reguladores de crescimento (2,4 mg/L 2,4-D + 1 mg/L 24-epiBr; 8 mg/L 2,4-D + 4 mg/L BAP); fontes de carbono (30 g/L de sacarose e 30 g/L de maltose) e diferentes fatores de stresse, nomeadamente calor (80°C), frio (-15°C), ácido salicílico (AS) (1 mg/L), prolina (250 mg/L), peróxido de hidrogénio (H₂O₂) (9 µL/L) e putrescina (2 mg/L) com o objetivo de testar o seu potencial na indução de *callus*. A combinação 2,4-D + 24-epiBr resultou em 10 % de explantes com *calli*, e a 2,4-D + BAP representou 30 %. Os meios com sacarose e maltose representaram, igualmente, 20% de explantes com *calli*. O frio induziu *callus* em 100% dos explantes contrariamente ao calor que apenas produziu 5 %. Em resposta ao AS, prolina, H₂O₂ e putrescina a indução de *callus* foi de 93%, 95%, 90% e 100%, respetivamente. As condições que levaram a maior produção de *callus* foram o frio e a putrescina. Estes resultados suportam a possível indução de *callus* nestas duas coníferas, e suportam dados preliminares no sentido da otimização de protocolos eficazes para a ES.

keywords

Calli induction; physical stress, chemical stress

abstract

Pinus elliottii and the hybrid *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea* have significant commercial importance. Therefore it urges the need to develop a battery of *in vitro* culture protocols for (micro)propagation and for general research (eg, physiology, molecular biology, etc.) of these conifers. The main objective of this study was to analyze the effect of various endogenous and exogenous factors on the induction of: a) *callus* tissue (important in fundamental studies of physiology, maintenance of germplasm, morphogenesis, etc.); b) embryogenic *callus* (important for plant regeneration by SE, cryopreservation studies, etc). For that, mature zygotic embryos (MZE), and the cotyledons were subjected to different concentrations of growth regulators (2 mg/L 2,4-D, 2 mg/L NAA and 0.02 mg/L TDZ). The first signs of callus appeared after 15 days. The most efficient concentration of growth regulators in MZE was 2 mg/L 2,4-D at a rate of induction of *calli* of 85% and cotyledons was 2 mg/L 2,4-D with 55% induction of *calli*. MZE were subjected to different concentrations of growth regulators (2.4 mg/L 2,4-D + 1 mg/L 24-epiBr, 8 mg/L 2,4-D + 4 mg/L BAP); carbon source (30 g/L sucrose and 30 g/L maltose) and different stress factors, in particular heat (80 °C), cold (-15 °C), salicylic acid (SA) (1 mg/L), proline (250 mg/L) hydrogen peroxide (H₂O₂) (9 µL/L) and putrescine (2 mg/L) in order to test its potential in inducing *callus*. The combination 2,4-D + 24 epiBr resulted in 10% of explants with *calli* and 2,4-D + BAP represented 30%. The media containing sucrose and maltose accounted also 20% of explants with *calli*. The cold induced callus from explants of 100% as opposed to heat produced only 5%. In response to SA, proline, putrescine and H₂O₂ induced *callus* was 93%, 95%, 90% and 100%, respectively. The conditions that led to higher production of callus were cold and putrescine. These results support the induction of *callus* in these two conifers, and support preliminary data towards the optimization of protocols for efficient SE.

Abreviaturas:

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

24-epiBr: “24-epibrassinolide”

ABA: ácido abscísico

AS: ácido salicílico

BAP: benzilaminopurina

DCR: “Douglas fir Cotyledon Revised”

ES: embriogénese somática

EZM: embriões zigóticos maduros

IBA: ácido indolbutírico

IAA: ácido indolacético

Kin: cinetina

LP: “Lepoivre”

MS: “Murashige e Skoog”

NAA: ácido 1-naftalenoacético

PE: *Pinus elliottii*

PEG: polietilenoglicol

TDZ: tiazurão

TRIA: triacontinol

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	3
1.1. Botânica	3
1.2. Ecologia.....	4
1.3. Importância económica	4
1.4. Espécies em estudo	5
1.4.1. Características gerais de <i>Pinus elliottii</i> Engelm.	5
1.4.2. Características gerais do híbrido <i>Pinus elliottii</i> x <i>Pinus caribaea</i>	6
1.5. Propagação clonal.....	7
1.6. Embriogénese somática.....	8
1.6.1. Perspetiva histórica.....	8
1.6.2. Fases da embriogénese somática	9
1.6.3. Vantagens e limitações de embriogénese somática	12
1.6.4. Fatores que afetam a embriogénese somática	13
1.6.4.1. Tipo de explante e genótipo	13
1.6.4.2. Desinfecção do material vegetal	15
1.6.4.3. Composição do meio de cultura.....	16
1.6.4.4. Fatores físicos relacionados com a cultura ES	22
1.6.4.5. Outros fatores de indução de ES	24
1.7. Estabilidade genética do processo de ES.....	25
1.8. Embriogénese somática em <i>Pinus</i> – state of art	27
1.9. Objetivos	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1. Material vegetal.....	31
2.1.1. Desinfecção do material vegetal	31
2.2. Indução de tecido caloso	32
2.2.1. Experiência I	32
2.2.1.1. Registo de dados	34
2.2.2. Experiência II	34
2.2.2.1. Análises histológicas	38
2.2.2.2. Registo de dados	38
RESULTADOS	40
3.1. Comparação de protocolos de desinfecção de sementes.....	40
3.2. Indução de tecido caloso	40
3.2.1. Experiência I	40
3.2.2. Experiência II	44
3.2.2.1. Análises histológicas	48
DISCUSSÃO	50
4.1. Indução de tecido caloso	52
CONCLUSÃO	60
ANEXOS	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

ano. Na sua maturidade os cones femininos têm de 3 a 60 cm de comprimento. Cada cone tem numerosas folhas protetoras em espiral, contendo cada uma destas duas sementes férteis (figura 1). As folhas protetoras mais próximas à base do cone são pequenas e estéreis, sem sementes. A maioria das sementes é pequena e alada para serem dispersadas pelo vento. A maturidade do cone é normalmente alcançada quando ele se abre libertando as sementes (Richardson 1998; Farjon, 1984; Mirov, 1967).

1.2. Ecologia

Os pinheiros adaptam-se bem a solos ácidos e alguns a solos calcários. Na generalidade requerem solos bem drenados ou seja solos mais arenosos (Mirov, 1967; Farjon, 1984; Richardson, 1998; CABI, 2002). No entanto, existem exceções, como é o caso de *P. elliotii* e *P. contorta* que podem tolerar solos muito húmidos. Geralmente os pinheiros adaptam-se a solos de média a baixa fertilidade, embora algumas espécies variem nos seus requisitos edáficos. Para que os pinheiros cresçam em solos inférteis é muito importante a associação simbiótica com fungos ectomicorrízicos (CABI, 2002).

Algumas espécies renascem após incêndios florestais e outras necessitam de fogo para regenerar (Mirov, 1967; Farjon, 1984; Richardson, 1998; CABI, 2002). O fogo é também importante para manter a árvore saudável, retirando a folhagem que é afetada por fungos (CABI, 2002). Embora o fogo seja crucial na manutenção da ecologia dos pinheiros, é por outro lado um grande perigo em pinheiros para uso comercial devido à combinação de condições climáticas, em que muitas espécies crescem, e inflamabilidade da sua folhagem (CABI, 2002). As sementes são geralmente dispersadas por animais como pássaros e esquilos (Mirov, 1967; Farjon, 1984; Richardson, 1998).

1.3. Importância económica

O *Pinus* é um género muito importante comercialmente para a produção de madeira nas regiões de clima temperado e tropical do planeta. Muitas espécies são usadas como matéria-prima na produção de celulose, utilizada na produção de papel. Além disso, a queda das suas folhas produz um efeito alelopático em

plantas de outras espécies, impedindo o crescimento de outras plantas que provocam uma redução na competição por água, luz e nutrientes nos pinhais.

Vários produtos florestais secundários provêm de pinheiros, tais como, a resina de algumas espécies (ex. *P. pinaster*) que é uma importante fonte de terebintina e outros óleos essenciais; as sementes comestíveis existentes em algumas espécies (ex. *P. pinea*, *P. edulis* e *P. sibirica*), denominados pinhões; e o uso ornamental de muitos pinheiros em parques e jardins e como árvore de natal (ex. *P. sylvestris* e *P. virginia*) (Mirov, 1967; Farjon, 1984; Richardson, 1998; CABI, 2002).

De facto, quase todas as espécies são amplamente utilizadas de alguma forma, para uma ou mais destas finalidades, a que muitas vezes acresce a produção de madeira como uma grande mais valia (CABI, 2002).

1.4. Espécies em estudo

1.4.1. Características gerais de *Pinus elliottii* Engelm.

A espécie *Pinus elliottii* (figura 2) pertence ao género *Pinus* que pertence à família Pinaceae, ordem Coniferales e classe Gymnospermae e tem como nome comum em inglês “slash pine” (Elesbão, 2011). As árvores adultas desta espécie apresentam alturas entre 18 a 30 m, tendo o diâmetro do tronco à altura do peito entre 60 a 80 cm (Almeida, 2011).

Esta espécie é originária do Sudeste da América do Norte abrangendo os estados de Alabama, Florida, Geórgia, Louisiana, Mississippi, Carolina do Norte, Carolina do Sul e Texas como apresentado na figura 3 (Elesbão, 2011). Na região nativa desta espécie, o clima caracteriza-se pelos verões chuvosos e temperatura média anual de 17°C (Aguiar *et al.*, 2011b) e frequentemente as plantas crescem em solos de textura argilosa a arenosa, ácidos e bem drenados (Almeida, 2011).

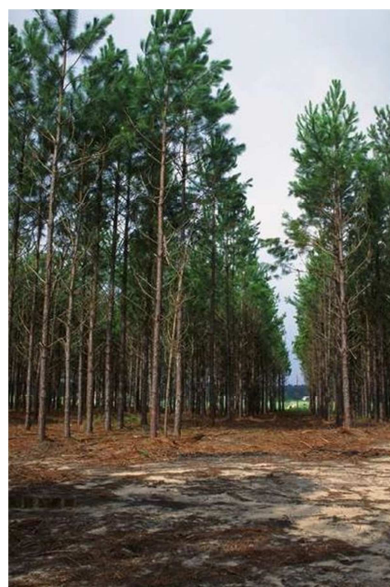


Figura nº 2: *Pinus elliottii*
Fonte: USDA (2006)

São reconhecidas duas variedades desta espécie: *Pinus elliottii* var. *elliottii* e *Pinus elliottii* var. *densa*. Esta última ocorre apenas na Florida (Newton *et al.*, 2005; Aguiar *et al.*, 2011b).

A espécie *P. elliottii* foi introduzida nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, sendo a segunda conífera mais plantada no Brasil para fins industriais. Apesar da sua baixa produtividade em termos de volume de madeira, comparativamente à espécie *P. taeda*, possui características bastante importantes para o sector florestal, como por exemplo: madeira de boa qualidade



Figura nº 3: Distribuição geográfica natural do *Pinus elliottii* nos EUA. **Fonte:** USDA (2010)

física e mecânica para processamento e uso em estruturas, embalagens e construção civil. Uma grande vantagem desta espécie, relativamente a *P. taeda*, é a produção de madeira adulta que se inicia mais cedo (7 a 8 anos) e produzir madeira de melhor qualidade física e mecânica. Também é usada para extração de resina. Uma vez que a produção de resina é uma característica hereditária, o melhoramento genético desta característica tem sido alvo de interesse comercial (Shimizu *et al.*, 1999, Aguiar *et al.*, 2011a).

1.4.2. Características gerais do híbrido *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea*

A espécie *Pinus elliottii* é conhecida por hibridizar com *Pinus caribaea*. Híbridos entre *P. elliottii* var. *elliottii* (PEE) e *P. caribaea* var. *hondurensis* (PCH) têm sido largamente plantados no sudeste e nordeste de *New South Wales* (Austrália) desde os anos 1990 (Orchard, 1998). O objetivo da produção de híbridos é aumentar a qualidade relativamente aos seus parentais. Visando o melhoramento genético das plantas, para obter melhores resultados tanto em precocidade, qualidade da madeira e produtividade de resina foi desenvolvida a espécie de *Pinus* híbrido, entre as espécies *P. elliottii* x *P. caribaea*. Ambos possuem

características complementares, isto é, o PEE possui tronco reto, é resistente a ventos fortes e mais tolerante a solos mal drenados que o PCH. Em contrapartida, o PCH possui crescimento mais acelerado, apresenta poucas ramificações e a madeira é mais uniforme (Almeida, 2011). De acordo com a Pinus Brasil, o híbrido apresenta uma redução de cerca de 10 anos entre implantação e corte final relativamente a *P.elliottii* e *P. taeda* (sendo estas as duas espécies predominantes nas regiões sul e sudeste do Brasil). A elevada precocidade e maior produtividade, diminuição de custos operacionais e consequentemente um retorno mais rápido no seu investimento, fazem do híbrido uma espécie bastante importante economicamente (Pinus Brasil, 2007).

1.5. Propagação clonal

A pressão causada pelo consumo cada vez maior de madeira ou outros produtos florestais tem levado ao desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas que complementam os programas de melhoramento florestal tradicionais de forma a produzir produtos de qualidade superior. A propagação clonal associada a programas de melhoramento pode ser uma ferramenta biotecnológica muito eficaz (Tolga, 2005). A propagação clonal permite a produção em larga escala de indivíduos geneticamente idênticos através da cultura de tecidos, órgãos ou células (Nehra *et al.*, 2005, Bonga *et al.*, 2010). Os métodos de propagação clonal incluem macropropagação e micropropagação na qual se inclui a embriogénese somática (ES).

A macropropagação envolve principalmente o enraizamento de estacas. Este método poderia ser eficaz e de custo eficiente para espécies florestais, no entanto, a idade da planta dadora é o principal obstáculo que impede a sua aplicação em massa em coníferas (Park, 2002). Esta é uma limitação séria para espécies florestais, porque, quando a qualidade de uma planta pode ser avaliada, esta pode ser demasiado velha para ser usada como dadora para a propagação em massa através da estacaria (Park, 2002).

A micropropagação permite melhor controlo e manipulação dos explantes do que os métodos convencionais. Na micropropagação muitas plantas podem ser

produzidas a partir de apenas um fragmento da planta (explante). Não é só a taxa de multiplicação que aumenta, mas o tempo médio de uma geração também é reduzido, pois o processo pode durar todo o ano, sob condições controladas de laboratório (Surendran *et al.*, 2000). A micropropagação por organogénese envolve a multiplicação de rebentos a partir de gomos axilares e a formação de gomos adventícios (George *et al.*, 2008a). Apesar da utilidade desta técnica, já demonstrada na propagação de espécies florestais economicamente muito importantes de *Eucalyptus* spp. (Le Roux *et al.*, 1991) e *Pinus radiata* (Aitken-Christie *et al.*, 1988), o custo elevado da produção de plantas por esta via é o fator mais limitante. Outras limitações estão associadas a problemas de enraizamento e à natureza do crescimento plagiotrópico das estacas *in vivo* em espécies de coníferas (Ozkurt, 2006).

Um caso particular da cultura *in vitro* é a ES, que cada vez mais aparece referenciado como método preferencial de propagação em larga escala comparativamente a outras técnicas de micropropagação.

A ES é o processo através do qual células somáticas, em condições adequadas de cultura, são reprogramadas para originar células embrionárias (Yang *et al.*, 2010). Essas células passam por uma sequência de alterações morfológicas e bioquímicas que resultam na formação de embriões somáticos e a criação de novas plantas numa clara demonstração de totipotência (Pinto *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010; Malabadi *et al.*, 2011a; Mulgund *et al.*, 2012a). A teoria da totipotência baseia-se no fato de que qualquer célula tem informação genética suficiente para regenerar um indivíduo (Gautheret, 1983).

1.6. Embriogénese somática

1.6.1. Perspetiva histórica

Desde as descrições iniciais do processo de ES em cenoura (Steward, 1958 em Chorabik, 2012) e da teoria da totipotência (Haberlandt, 1902 em Purohit, 2013), a formação de embriões somáticos foi conseguida em muitas espécies vegetais, incluindo angiospérmicas e gimnospérmicas (Breton *et al.*, 2004, Park *et al.*, 2006,

Szczygiel *et al.*, 2007, Aronen *et al.*, 2009a). As primeiras referências de ES em gimnospérmicas ocorreram no início de 1970 com as descrições da estrutura do embrião em *Pinus banksiana* (Durzan *et al.*, 1976). No entanto estas estruturas não foram capazes de manter o desenvolvimento. No início de 1980, os embriões somáticos foram convertidos em plântulas a partir de embriões zigóticos imaturos de *Picea abies* (Chalupa 1985, Hakman *et al.*, 1985). Nas últimas duas décadas, esta tecnologia desenvolveu-se rapidamente devido ao seu impacto sobre a indústria florestal. A aplicação desta técnica em coníferas é um processo mais difícil, pois muitas espécies são recalcitrantes em condições *in vitro* (Bonga *et al.*, 2010). Contudo, a ES tem sido induzida com sucesso em muitas espécies de coníferas (Attree *et al.*, 1993, Stasolla *et al.*, 2002, Stasolla *et al.*, 2003, Park *et al.*, 2006, Szczygiel *et al.*, 2007, Aronen *et al.*, 2009a, Pullman *et al.*, 2009, Bonga *et al.*, 2010).

1.6.2. Fases da embriogénese somática

Um protocolo de ES divide-se normalmente em duas fases principais: indução e expressão (Jiménez, 2005). Na fase de indução as células somáticas, p. ex. embrião zigótico maduro (figura 4A), adquirem competência embriogénica através da reorganização do estado celular, incluindo fisiologia, metabolismo e expressão génica (Fehér *et al.*, 2002). Estas células embriogénicas competentes têm características específicas, tais como a ativação precoce do ciclo celular, o pH vacuolar alcalino, alteração do metabolismo da auxina e cloroplastos não funcionais (Pasternak *et al.*, 2002). O *callus* embriogénico em coníferas é normalmente transparente ou esbranquiçado e mucilaginoso (figura 4B) (Hakman *et al.*, 1985). Para determinar se o *callus* é embriogénico ou não, podemos corar uma amostra com carmim acético. Em caso positivo, permite observar ao microscópio os proembriões (exemplo na figura 5).

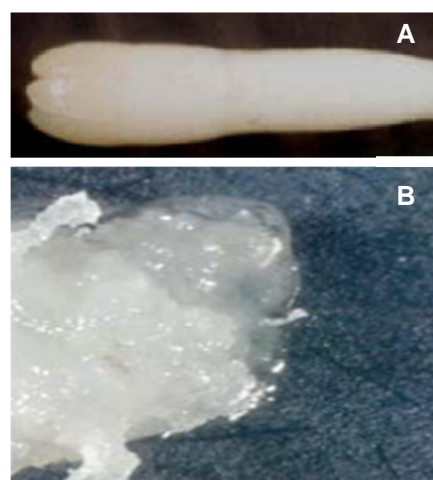


Figura nº 4: (A) Embrião zigótico maduro de *P. pinaster*. **Fonte:** Marum (2009).

(B) *Callus* embriogénico obtido de embrião zigótico maduro de *P. caribaea*. **Fonte:** Malabadi (2011b)

Em *callus* de gimnospermas as massas embriogénicas são distinguidas quando pequenas células são intensamente coradas de vermelho, às vezes em pequenos conjuntos ou subtendidas por células vacuolizadas longas (Newton, 2005).

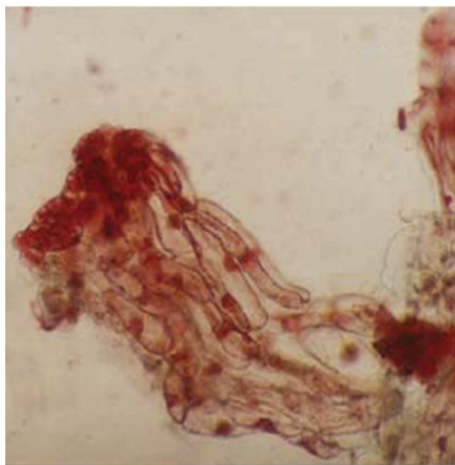


Figura nº 5: Preparação de tecido embriogénico com carmim acético mostrando um suspensor embrional bem desenvolvido. **Fonte:** Malabadi (2011b)

Nem todos os *calli* são embriogénicos e capazes de proliferação intensiva. A competência embriogénica é determinada geneticamente, e apenas alguns genótipos apresentam elevada competência. A origem do material vegetal, particularmente das sementes, tem um impacto significativo na capacidade embriogénica do *callus* (Trigiano, 2011). Para se obter maiores quantidades de tecido embriogénico (proliferação de *calli* ou massas embriogénicas) é, em muitos casos, necessário proceder à passagem do *callus* para um meio

idêntico ao anterior mas com maiores concentrações de citoquininas e a adição de caseína (no caso de gimnospermas) porque estes reguladores aumentam a estimulação da divisão celular (Jiménez, 2005).

Depois do estímulo apropriado, que acontece após uma mudança de uma ou mais condições de cultura (por exemplo, meio de cultura, reguladores de crescimento, fonte de carbono, potencial osmótico, fatores de stress etc.), os tecidos entram na fase de expressão através da qual células competentes ou proembriões começam a desenvolver-se e a diferenciarem-se em embriões somáticos (Jiménez, 2001; Fehér, 2005). Na fase de expressão, o sinal hormonal é normalmente retirado para que ocorra formação e desenvolvimento dos embriões (Chorabik, 2012). Durante esta fase os embriões somáticos passam por fases muito semelhantes às do embrião zigótico, que em coníferas estão divididas em três fases sequenciais: globular, pré-cotilédonar e pós-cotilédonar (figura 6A) (Yang *et al.*, 2010). Pode ser necessário promover-se a maturação dos embriões somáticos, através de, por exemplo, adição de ácido abscísico (ABA) e/ou agentes osmóticos (sorbitol, manitol). A acumulação de reservas nesta etapa pode influenciar positivamente a etapa seguinte da germinação, onde o meio é

suplementado com ácido indolbutírico (IBA), que induz o enraizamento dos embriões na fase cotiledonar. Nomeadamente em gimnospéricas tem sido referido como necessário um tratamento adicional (chamado dessecação) de secagem dos embriões cotiledonares sob condições de baixa humidade ou elevadas concentrações de agentes solidificantes no meio de cultura que promove a germinação (figura 6B) para posterior transferência das plantas para condições *in vivo* (aclimatização) (Chorabik, 2012).

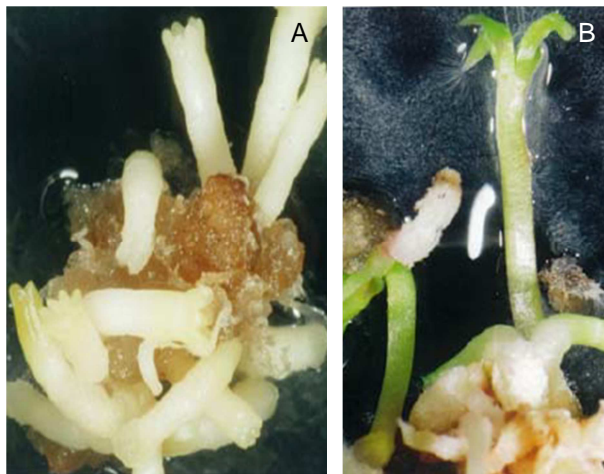


Figura nº 6: (A) Embriões somáticos na fase cotiledonar em meio de maturação; (B) Embriões na fase de germinação. **Fonte:** Malabadi (2011)

O sucesso da propagação *in vitro*, num programa de reflorestamento depende de um protocolo de aclimatização confiável, garantindo baixo custo e elevadas taxas de sobrevivência (Hazarika, 2006). Os protocolos *in vitro* fornecem, para alguns fatores, o mínimo de stress e as condições ideais para a multiplicação das plantas (Hazarika, 2006). Como consequência destas condições especiais (p.ex. elevada humidade, baixa luminosidade, baixo CO₂ durante o fotoperíodo, elevados níveis de fontes de carbono e reguladores de crescimento), as plântulas produzidas *in vitro* podem exibir morfologia, anatomia e/ou fisiologia anormal (Hazarika 2006; Pospisilova *et al.*, 1999; Premkumar *et al.*, 2001). Sob estas condições, plântulas *in vitro* podem desenvolver características específicas (por exemplo, as raízes e/ou estomas não funcionais) que são incompatíveis com o desenvolvimento em condições de estufa (figura 6) ou campo.



Figura nº 7: Clones de *P. pinaster* na fase de aclimatização em estufa. **Fonte:** Klimaszewska (2007)

1.6.3. Vantagens e limitações de embriogénese somática

Tem existido um aumento do interesse científico e industrial na aplicação de ES na propagação de espécies lenhosas. Esta técnica oferece, para além de uma elevada eficácia de propagação, outras potencialidades tais como: conservação de germoplasma / criopreservação, produção de sementes artificiais, produção clonal em bioreatores e regeneração de plantas transformadas (Vicient *et al.*, 1998; Jiménez, 2001; Deo *et al.*, 2010; Chorabik, 2012). Com este método é também possível contornar o problema da idade, que se verifica no caso da estacaria (Klimaszewska *et al.*, 2002; Nehra *et al.*, 2005; Bonga *et al.*, 2010); não é necessário recorrer a uma fase de enraizamento, pois os embriões somáticos são estruturas bipolares que já apresentam meristema apical radicular (Pinto *et al.*, 2009); a qualidade fitossanitária das plantas está garantida pois os embriões somáticos não se apresentam contaminados por vírus (Jain, 2012) e ainda proporcionar um meio de propagação em massa de espécies selecionadas, em perigo, híbridos ou transgénicas (Pijut *et al.*, 2011; Maruyama *et al.*, 2005).

No entanto existem algumas limitações que têm de ser ultrapassadas para que estes protocolos apresentem viabilidade económica. A primeira refere-se ao facto de o desenvolvimento dos embriões somáticos não ser sincronizado podendo, assim, embriões em todas as fases estar presentes no meio de cultura. A segunda limitação é a estabilidade genética das linhas celulares que podem apresentar variação somaclonal e embriões anormais (Deo *et al.*, 2010).

Em *Pinus* são as reduzidas frequências de indução e maturação (Jones, 2002) e a existência de espécies recalcitrantes, ou seja, existência de espécies que falham no processo de propagação *in vitro* mesmo aplicando as mais recentes descobertas de reguladores de crescimento (ex. brassinosteroides) e outros componentes do meio de cultura. As principais causas possíveis da recalcitrância são:

- a) início precoce da recalcitrância, ou seja, recalcitrância do tipo de explante usado, p.ex. para muitas espécies de coníferas embriões zigóticos maduros (EZM) são não-responsivos tendo de ser usados embriões

- zigóticos imaturos (ex. *P. banksiana* (Park *et al.*, 2006) e *Juniperus communis* (Helmersson *et al.*, 2009));
- b) distribuição não uniforme da recalcitrância dentro da mesma planta, p. ex. em EZM de *P. abies* a ES está restrita apenas ao hipocótilo superior (Ramarosandratana *et al.*, 2003);
 - c) momento de extração do explante, p.ex. em *L. decídua* explantes do caule produzem embriões somáticos se os explantes forem extraídos no início da primavera ou final do verão (Bonga, 1997).
 - d) não ocorre apomixia natural, uma forma de copiar a apomixia natural em explantes é induzir meiose por meios artificiais e terminá-la antes da formação do saco embriogénico ou induzir a formação do saco embriogénico sem a anterior indução da meiose (Bonga *et al.*, 2010).

1.6.4. Fatores que afetam a embriogénese somática

A indução de ES está associada a condições artificiais, elevados níveis de reguladores de crescimento e outros fatores que, induzindo stress, estão descritos como promover a indução ES (Zavattieri *et al.*, 2010; Malabadi *et al.*, 2011; Mulgund *et al.*, 2012a). Vários fatores podem ditar o sucesso deste tipo de propagação: o tipo de explante, a composição do meio de cultura (ex. sais minerais, hidratos de carbono, reguladores de crescimento), o seu pH, ou ainda fatores físicos tais como a temperatura e a intensidade luminosa (Guerra *et al.*, 1999, Deo *et al.*, 2010; Mulgund *et al.*, 2012a). O desequilíbrio de qualquer um destes fatores, ou a adição complementar de agentes associados a stress, influenciam também o sucesso da propagação (Zavattieri *et al.*, 2010).

1.6.4.1. Tipo de explante e genótipo

A seleção do tipo de explante é muito importante na indução de ES em coníferas e está dependente das espécies estudadas (McCown *et al.*, 2000; Von *et al.*, 2000). Em coníferas, culturas embriogénicas foram iniciadas a partir de embriões zigóticos imaturos, embriões zigóticos maduros e tecidos excisados a partir de plântulas (principalmente os cotilédones) (Becwar *et al.*, 1990; Lelu *et al.*, 1990a; Attree *et al.*, 1991 e Malabadi *et al.*, 2005c).

Muitos explantes de coníferas foram induzidos a formar embriões somáticos, incluindo exemplos dos gêneros *Abies*, *Larix*, *Picea*, *Pinus*, *Pseudotsuga*, e *Sequoia* (Tautorus *et al.*, 1991). Os explantes de maior sucesso utilizados para *Pinus* são embriões imaturos na fase pré-cotiledonar e embriões maduros na fase cotiledonar (Pullman *et al.*, 2009).

Existem fatores a considerar na escolha do explante, destacando-se:

- a) a idade dos tecidos ou órgãos das plantas parentais. A escolha deve ser preferencialmente em tecidos ou órgãos mais jovens pois estes têm normalmente um potencial mais elevado de sucesso (Chorabik, 2012).
- b) a localização do explante no meio também é importante, por exemplo, embriões zigóticos devem ser colocados numa posição horizontal no meio solidificado pois há variação no desenvolvimento dos explantes no meio devido à polaridade natural dos fragmentos vegetais (Chorabik, 2012).
- c) o período sazonal em que o explante é recolhido pode também influenciar, por exemplo, embriões zigóticos imaturos devem ser extraídos de cones fechados em Junho, enquanto embriões zigóticos maduros devem ser isolados de sementes não armazenadas adquiridas imediatamente após maturidade fisiológica (Tolga, 2005). Este fator está associado ao ritmo natural das plantas parentais. O ritmo natural das plantas parentais afeta a embriogénese e, de um ponto de vista fisiológico, está relacionado com o período de mais intensa atividade metabólica e enzimática das células, que é mais intensiva na primavera (Chorabik, 2012).
- d) o estado fitossanitário também influencia severamente o potencial embriogénico dos explantes.
- e) o tempo de armazenamento das sementes também condicional a resposta dos explantes. Particularmente de coníferas, este deve ser reduzido pois os dados disponíveis apontam para uma maior frequência embriogénica ser obtida em sementes armazenadas apenas durante um curto espaço de tempo (Häggman *et al.*, 1999).
- f) o genótipo da planta. A influência genética durante o processo de ES está bem documentado (Merkle *et al.* 1995) e compreender o controlo genético é um elemento importante na melhoria do processo de ES (Park *et al.*,

1998; Pinto *et al.*, 2008). Dependendo do tipo e magnitude da variação genética, melhorias na taxa de indução de ES podem ser introduzidas em genótipos recalcitrantes (Park *et al.*, 1998, Park, 2002). Tais diferenças genotípicas na capacidade da ES podem refletir diferenças atuais na capacidade para ativar elementos-chave na via embriogénica (Merkle *et al.*, 1995; Thorpe, 1995).

Outros fatores ligados ao material biológico poderão ainda afetar a indução de ES incluindo por exemplo, o tamanho do explante, densidade nas caixas/frascos, processos de desinfecção usados, etc.

1.6.4.2. Desinfecção do material vegetal

Os protocolos de desinfecção de explantes de origem florestal são bastante difíceis de otimizar devido à contaminação da maioria dos órgãos da planta com bactérias e fungos endofíticos (Kowalski *et al.*, 1992). O protocolo deve ser otimizado para uma população determinada de uma espécie florestal específica e para o tipo de explante que irá ser utilizado, para que o agente químico usado seja eficaz contra microrganismos (Chorabik, 2012) e também permita a viabilidade do explante em cultura. Para facilitar a desinfecção é necessário a adição de substâncias que reduzem a superfície de tensão e facilitam a penetração na superfície do material vegetal, ex. detergentes . Pode ainda ser necessário a adição de fungicidas ou antibióticos, que podem no entanto ter impacto negativo na taxa de indução de *callus* (Chorabik, 2012).

Alguns autores referem o uso de peróxido de hidrogénio (7-12% durante 5-15 min.) em embriões maduros no género *Pinus*, nomeadamente em *P. nigra* (Radojevic, 1998; Chorabik, 2012). No entanto, outros autores referem o uso de peróxido de hidrogénio (6%) juntamente com hipoclorito de sódio (4-5%) e citramida (1%) em *P. kesiya*, *P. roxburghii*, *P. wallichiana*, *P. caribaea*, *P. roxburghii*, *P. gerardiana*, e cotilédones de *P. roxburghii* (Malabadi *et al.*, 2005a, 2007a, 2007b, 2007c, 2007d, 2008a, 2011b). Contudo, também já foi usado cloreto de mercúrio (0,1% durante 20 min.) em embriões maduros de *P. taeda* (Tang *et al.*, 2001) e em embriões imaturos de *P. elliottii* (Newton *et al.*, 2005).

1.6.4.3. Composição do meio de cultura

A escolha do meio de cultura é um dos passos mais importantes para implementar qualquer técnica de cultura de tecidos com sucesso em qualquer espécie vegetal. A composição dos componentes básicos do meio e a concentração de reguladores de crescimento são por isso normalmente ajustados às características do material biológico em estudo, em quase todos os passos da ES.

Os meios de cultura são compostos por sais minerais (macro- e micronutrientes), vitaminas, uma fonte de carbono e reguladores de crescimento e às vezes suplementados com aminoácidos específicos (Chorabik, 2012).

Sais minerais e vitaminas

Os macronutrientes (N, K, P, Ca, Mg, S) são adicionados até 3000mg/dm^{-3} na forma de sais inorgânicos. É essencial manter o balanço entre catiões (NH_4^+) e aniões (NO_3^-) na indução da ES. Os macronutrientes são fundamentais para diversas funções nas plantas, isto é, na síntese de proteínas, ácidos nucleicos e para manter o equilíbrio hídrico das células das plantas. Também são importantes para a permeabilidade da membrana citoplasmática e para a síntese de clorofila (Ramage *et al.*, 2002, Chorabik, 2012). O aumento de Ca^{2+} é bastante importante, foi demonstrado em *Pinus patula*, que a uma concentração ótima de 4 mM em meio DCR ("Douglas-fir cotyledon revised") durante um pré-tratamento a frio é necessária para a indução da 3embriogénese (Malabadi *et al.*, 2011a).

Por outro lado, os micronutrientes (Fe, Cu, Zn, Mn, B, Mo, I, Al) são adicionados em concentrações mais baixas, de 0,03 a 100 mg/L. Contudo, estas baixas concentrações podem resultar na inibição de proliferação de *callus*. Em contrapartida, pode-se impedir este fenómeno aumentando as concentrações de zinco (Zn) na forma hidratada ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Os micronutrientes também são essenciais ao funcionamento da planta sendo necessários na síntese da clorofila, funcionamento dos cloroplastos, e assimilação de nitrogénio atmosférico (Ramage *et al.*, 2002, Chorabik, 2012).

As **vitaminas** são muito importantes no melhoramento das condições fisiológicas das células, como intermediários essenciais ou catalisadores metabólicos

(George *et al.*, 2008b), e são necessárias para a proliferação de *callus* de espécies florestais do género *Abies* e *Pinus* (Thorpe, 1995; Chorabik, 2012). As mais utilizadas são a tiamina (vitamina B₁), ácido nicotínico (vitamina B₃), piridoxina (vitamina B₆), ácido fólico (vitamina B₉), mio-inositol (forma isomérica da vitamina B₈), biotina (vitamina H) (Bonga *et al.*, 1992; Thorpe, 1995; George *et al.*, 2008b) e ácido amino-benzoico (George *et al.*, 2008b). De acordo com Pullman (2006), as vitaminas B₁₂ e E tem efeitos benéficos para a iniciação de ES em *P. taeda*, ambas a concentrações de 0,1 mg/L (Pullman *et al.*, 2006). Relativamente ao ácido amino-benzoico, foi usado em concentrações de 0,2 g/L em *Pinus gerardiana*, *P. wallichiana* e *P. caribaea* (Malabadi *et al.*, 2007a, Malabadi *et al.*, 2007b e Malabadi *et al.*, 2011b). Quando adicionado ao meio concentrações de mio-inositol de 50 mg/L há uma maior proliferação de *callus* em *P. strobus*, contrariamente ao que acontece com *P. echinata* que na ausência de mio-inositol há maior rapidez na proliferação de *callus* (Kaul *et al.*, 1985).

Aminoácidos

Os aminoácidos desempenham um papel muito importante nas diferentes fases da ES (Garín *et al.*, 2000; Ramage *et al.*, 2002; Gerdakaneh *et al.*, 2011).

Estudos realizados com glutamina e prolina descrevem que estas melhoram a ES fornecendo nutrição ou funções como o armazenamento de reservas nutricionais de nitrogénio e carbono, como também melhoram a maturação dos embriões somáticos (Bonga *et al.*, 1992; Garín *et al.*, 2000; Gerdakaneh *et al.*, 2011).

Foi demonstrado que a prolina é mais eficaz que a glutamina e alanina na ES. A prolina é conhecida por estimular indução de auxina e alongar os embriões somáticos no meio sem hormonas (Gerdakaneh *et al.*, 2011).

Fonte de carbono

Outro fator muito importante na iniciação de ES é a fonte de carbono (Mulgund *et al.*, 2012a). Os hidratos de carbono são essenciais para a síntese de compostos orgânicos; atuam como estabilizadores do balanço osmótico no meio, que afeta a absorvência de substâncias que influenciam o desenvolvimento de células embriogénicas (Lipavska *et al.*, 2004) e são essenciais na histodiferenciação dos

embriões somáticos através da regulação da expressão genética (Lipavská *et al.*, 2000, Blanc 2002). Foi demonstrado que na indução de ES das fontes de carbono testadas, incluindo sorbitol, manitol, glucose, frutose, sacarose e maltose, as que apresentaram melhores resultados durante a ES em *Pinus* e outras coníferas foram a sacarose e a maltose. (Iraqi *et al.*, 2001; Ramarosandratana *et al.*, 2001; Aronen *et al.*, 2007; Aronen, 2009b; Malabadi *et al.*, 2003, 2004, 2005b, 2005c, 2005d, 2006, 2007, 2008a, 2008b).

Na iniciação de ES, quando usada sacarose (20 a 40 g/l) houve produção de callus embriogénico e não embriogénico, contudo foi obtida maior quantidade de callus não embriogénico. No entanto, quando o meio é suplementado com maltose (30 g/l) resultou numa maior quantidade de callus embriogénico durante a indução de ES de *P. kesiya*, *P. roxburghii*, *P. wallichiana*, *P. patula* e *P. sylvestris* (Aronen *et al.*, 2007; Aronen, 2009b; Malabadi *et al.* 2003, 2004, 2005b, 2005c, 2005d, 2006, 2007, 2008a, 2008b).

Foi também publicado que a maltose (9%) é essencial na maturação de embriões somáticos de *Pinus taeda* (Li *et al.*, 1998) e *Pinus pinaster* (Ramarosandratana *et al.*, 2001). Alguns autores sugerem que a maltose pode ativar uma via metabólica comum com ABA (ácido absicico) (Finkelstein *et al.*, 2001; Leo *et al.*, 2003).

O efeito benéfico da maltose pode ser devido á sua hidrólise lenta, sendo este o sinal bioquímico que conduz á formação de embriões somáticos. Pelo contrário, a rápida hidrólise da sacarose pode aumentar o conteúdo de hexoses e armazenamento de compostos, resultando na proliferação rápida das células (Blanc, 2002).

Em culturas embriogénicas de *A. angustifolia* quando o meio é suplementado com sacarose as células proliferam-se de forma desorganizada enquanto que a maltose é possivelmente, o fator-chave para iniciar a organização do desenvolvimento das células embriogénicas (Steiner *et al.*, 2005).

Reguladores de crescimento

Os reguladores de crescimento influenciam o crescimento e desenvolvimento de *callus* através da regulação da expressão génica. Podem ser auxinas, citoquininas, giberelinas e inibidores. A proporção auxina para citoquinina é de

particular importância nas fases iniciais da embriogénese (Jiménez, 2005). A presença de auxinas como 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), IBA, picloram é essencial para a indução da embriogénese e enraizamento de embriões somáticos na fase cotiledonar (Jiménez, 2005). De entre as diferentes auxinas utilizadas na ES, o 2,4-D é o mais eficiente e por isso é a mais utilizada (Jiménez, 2005; Malabadi *et al.*, 2011a). Citoquininas tais como BAP (benzilaminopurina), KIN (cinetina), TDZ (tidiazurão) promovem a proliferação de *callus* e formação de embriões somáticos na fase globular (Jiménez, 2005). Durante a propagação de *Pinus*, uma combinação de NAA (Ácido 1-naftalenoacético), 2,4-D e BAP a uma concentração ótima de 26.85 µM, 22.62 µM e 8.87 µM, respetivamente, em meio DCR induz ES. Concentrações mais elevadas ou baixas de NAA, 2,4-D e BAP podem resultar na indução de tecido não-embriogénico (Malabadi *et al.*, 2011a; Mulgund *et al.*, 2012a).

Em contrapartida, ABA é usado nas últimas fases da ES para a maturação dos embriões somáticos. Além disso aumentam a resistência das células a condições de *stress* (Jiménez, 2005; Malabadi *et al.*, 2011a). Em *Pinus*, a maturação dos embriões somáticos é influenciada pela aplicação de ABA e é eficaz apenas sem reguladores de crescimento (Malabadi *et al.*, 2011a).

O AS (ácido salicílico) é um regulador de crescimento envolvido em respostas de defesa da planta a patogénicos e stresse abiótico como também no crescimento e desenvolvimento da planta. Em ES está envolvido no funcionamento de vários sistemas de sinalização (Mulgund *et al.*, 2012b).

O regulador de crescimento TRIA (triacontinol) foi usado pela primeira vez em ES em *P. Kesiya* e posteriormente em *P. roxburghii* em dois tipos de explantes, tendo um efeito positivo ao resultar na elevada percentagem de *callus* embriogénico (Malabadi *et al.*, 2005a; Malabadi *et al.*, 2007b; Malabadi *et al.*, 2007c; Malabadi *et al.*, 2011a). A adição de TRIA induz o aumento o peso da semente, conteúdo da clorofila das folhas, promove a fotossíntese, ramificação e enraizamento (Malabadi *et al.*, 2005a).

Os brassinosteroides são um grupo de lactonas esteroidais que incluem brassinolide e seus análogos. Em vários estudos, foi demonstrado que brassinolide é mais ativa que, ou sinérgica com, auxinas tais como IAA ou NAA

(Malabadi *et al.*, 2011a). Foi demonstrado em *P. wallichiana* e *P. caribaea* que 24-epiBr (24-epiBrassinolide) a 2 μ M que promoveu a formação de tecido embriogénico a partir de EZM (Malabadi *et al.*, 2007a; Malabadi *et al.*, 2010).

As poliaminas, espermidina e espermina e o seu precursor putrescina estão envolvidas na modulação de muitos metabolismos vegetais e são consideradas hormonas vegetais (Silveira *et al.*, 2004, Noceda *et al.*, 2009). Verificou-se que as atividades de poliaminas aumentaram regularmente durante o desenvolvimento de embriões somáticos a partir da massa suspensora embriogénica até estágios precoces cotiledonares (Niemi *et al.*, 2002, Noceda *et al.*, 2009). Poliaminas desempenharam um importante papel quantitativo e qualitativo durante a maturação de embriões somáticos de *P. taeda* (Silveira *et al.*, 2004) e *P. sylvestris* (Niemi *et al.*, 2007).

Outros compostos

Carvão ativado é usado em algumas fases da ES, normalmente durante a mudança da composição do meio entre as fases sucessivas da embriogénese (Thomas, 2008). Os benefícios do carvão ativado prendem-se com o facto de estabelecer polaridade pelo escurecimento do meio e adsorção de substâncias inibitórias produzidas pelo meio ou explante (Pan, 1998). O uso de carvão ativado (0,3%), como pré-tratamento, aumentou a sobrevivência dos explantes de *P. kesiya*, *P. roxburghii*, *P. wallichiana*, *P. patula* e *P. sylvestris*, e posteriormente resultou na indução de tecido embriogénico em meio de indução (Aronen *et al.*, 2007; Aronen, 2009b; Malabadi *et al.*, 2003, 2004, 2005b, 2005c, 2005d, 2006, 2007, 2008a, 2008b). A adição de carvão ativado representa um papel importante na remoção de toda a exsudação fenólica e químicos tóxicos lixiviados durante a propagação *in vitro* de *Pinus* (Thomas, 2008). Contudo, elevadas concentrações têm um efeito inibitório na propagação *in vitro* de *Pinus* (Malabadi, 2007e; Mulgund *et al.*, 2012a).

Antioxidantes

Os radicais livres são frequentemente produzidos pelo fermento e pode resultar na oxidação de tecidos (Pinto *et al.*, 2007). Vários antioxidantes, tais como a

cisteína, ditioneitol e uma combinação de ácido ascórbico com ácido cítrico, têm sido avaliados na gestão dos danos fenólicos para tecido excisado (Malabadi *et al.*, 2011a). De acordo com um estudo realizado em *P. patula*, podemos verificar que um pré-tratamento dos explantes ou incluindo no meio os antioxidantes reduz a produção de embriões somáticos. Contudo, a adição de antioxidantes como pré-tratamento dos explantes têm um efeito positivo na redução da necrose do tecido e na redução da oxidação de compostos fenólicos, no entanto a produção de embriões somáticos é reduzida. No entanto, existe uma exceção, quando se usa ditioneitol a uma concentração ótima de 0,1% como pré-tratamento dos explantes causa uma redução do escurecimento do tecido, bem como promove a iniciação da embriogénese em *P. patula* (Malabadi *et al.*, 2005b; Malabadi *et al.*, 2011a). No entanto o uso de antioxidantes deve ser usado com cuidado pois vários autores descrevem o seu papel inibitório na indução de ES (Pinto *et al.*, 2007).

Agente solidificante

Dois tipos de agentes solidificantes (gelrite e agar) são frequentemente utilizados na ES de coníferas. A gelrite é um polissacarídeo bacteriano (*Pseudomonas elodea*) composto por ácido glucurónico, ramnose e de glucose, enquanto que o agar é derivado de algas (Scherer *et al.*, 1988). É recomendado o uso de gelrite para a indução de ES do género *Pinus* a concentrações de 3.8 g/l (Chorabik, 2012). Elevadas concentrações de agentes solidificantes estimulam a maturação dos embriões somáticos, reduzindo a disponibilidade de água no meio (Klimaszewska *et al.*, 1997; Garin, 2000). Em *P. strobus* o uso de elevadas concentrações de gelrite (1%) resultou numa taxa elevada de maturação de embriões somáticos (Klimaszewska *et al.*, 1997). Vários autores recomendam a substituição do agar por gelrite, pois verificou-se um desenvolvimento superior de embriões somáticos em *Larix x eurolepis*, *Picea mariana*, *P. rubens*, *P. radiata* e *P. kessya* em meio solidificado com gelrite (Klimaszewska 1989; Cheliak *et al.*, 1991; Tremblay *et al.*, 1991; Smith 1994; Malabadi *et al.*, 2004).

O **pH** é um dos fatores químicos importantes na indução de ES. A transição do estado somático para embriogénico da célula (competência embriogénica) é um

processo complexo. Alterações características no pH intracelular estão associadas a esta transição. O pH celular é um marcador positivo na diferenciação e ativação celular (Fehér *et al.*, 2003; Namasivayam, 2007). Mudanças no pH citoplasmático são necessárias para controlar o ciclo celular e divisão e proliferação celular (Fehér *et al.*, 2003; Namasivayam, 2007). Os valores de pH nos vacúolos e cloroplastos podem servir como indicadores da competência embriogénica. O aumento do pH do citoplasma correlaciona-se com a divisão celular, embora ainda não se saiba se a alcalinização citoplasmática serve como um sinal mitótico ou é uma consequência da ativação celular (Fehér *et al.*, 2003; Namasivayam, 2007). O desenvolvimento de callus e embriões em coníferas é realizado em pH ácido, isto é, entre os valores de pH 5,6-5,8 (Malabadi, 2012a).

1.6.4.4. Fatores físicos relacionados com a cultura ES

Além das condições químicas do meio de cultura existem fatores físicos relacionados com as condições ambientais em que ocorre a cultura: tais como, a temperatura, luz, intensidade luminosa e humidade relativa. Estes fatores devem ser rigorosamente coordenados, mas também devem ser coordenados com fatores químicos presentes na composição do meio (Phillips, 2004).

A **temperatura** é um fator importante para uma indução de ES bem-sucedida que deve ser mantida a temperaturas constantes durante o dia e durante a noite. Apenas em raras exceções é necessário aplicar variações de temperatura. Normalmente, a temperatura numa câmara fitoclimática varia entre 23-25°C. Contudo, a temperatura ótima irá depender da espécie em estudo e do tipo de explante e cada fase da cultura pode necessitar de diferentes temperaturas. No entanto, explantes de espécies florestais respondem melhor a temperaturas ligeiramente mais baixas relativamente à sua temperatura ótima do que a aumentos de temperatura (Chorabik, 2012).

A **luz** é um fator que tem bastante impacto nas mudanças morfogénicas, que muitas vezes são induzidas por este fator nas diferentes fases da ES. A

intensidade, o comprimento de onda e a duração da luz na indução de ES podem influenciar a resposta morfogénica e a sua eficácia (Gaj, 2004).

A qualidade da luz afeta principalmente as fases de germinação e aclimação em ES (Merkle *et al.*, 2006). De acordo com um estudo realizado na Universidade de Cracow, foi concluído que luz LED branca, difusa e de baixa intensidade, num fotoperíodo de 12h é necessária apenas durante a conversão dos embriões. A luz branca é a mais fotossintética devido à sua similaridade com as condições naturais e afeta a indução da síntese de clorofila, desenvolvimento de cloroplastos e formação de órgãos adventícios através das células de callus. Durante a fase de aclimação as plântulas devem ser mantidas em condições semelhantes às naturais, ou seja, elevada intensidade luminosa (ótima para cada espécie). Foi demonstrado também que o uso de luz LED azul num fotoperíodo de 12h tem efeitos benéficos na proliferação de callus e consequente formação de embriões pois os processos morfogénicos são mais rápidos e os embriões somáticos maduros são corretamente transformados em plântulas (Chorabik, 2012). Kvaalen *et al.* (1999) referiram que a luz vermelha, melhora as frequências de germinação de embriões somáticos de *P. abies* e promove o crescimento do hipocótilo e raiz principal (Kvaalen *et al.*, 1999). Particularmente, a fase de indução de callus na maioria das espécies florestais desenvolve-se sem luz devido ao facto de que a produção de callus não requer intensa atividade fotossintética (Chorabik, 2012).

A **humidade relativa** determina o conteúdo de vapor de água no recipiente onde a cultura é acompanhada (*in vitro*) e posteriormente na fase de aclimação (*ex vitro*) e depende de fatores como a temperatura, composição química do meio, tamanho dos explantes, recipientes e intensidade da luz (Pospisilova *et al.*, 1999; Hazarika, 2006). Para um meio com a mesma temperatura que por ex. uma placa de Petri selada, a humidade relativa é teoricamente de 98-99%. Contudo, nas camaras fitoclimáticas, a humidade relativa deve estar definida para oscilar entre 50-70% (Chorabik, 2012). Uma das estratégias para a preparação da passagem das plântulas para a fase de aclimação resume-se no facto de diminuir a humidade relativa *in vitro*, isto é, usando um dessecante e aumentando a concentração de açúcar ou de ágar ou adicionando agentes osmóticos tais como

o polietileno glicol ao meio também pode diminuir a umidade relativa. Esta estratégia é bastante importante para facilitar a passagem das plântulas para a fase de aclimação, diminuindo a transpiração destas (Hazarika, 2006).

1.6.4.5. Outros fatores de indução de ES

A ES consiste na substituição de padrões de expressão genética existentes no tecido do explante num novo programa de expressão genética embriogénico (Chugh *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2007). Isto é apenas possível se as células são competentes e recebem o estímulo indutor apropriado. A competência embriogénica é expressa ao nível das células e essas células são capazes de se diferenciar em embriões se receberem indutores de diferenciação (Fehér, 2005). Duas categorias de condições indutivas que permitem que células diferenciadas se transformem em células desdiferenciadas competentes são agora reconhecidos, estes são: reguladores de crescimento (a nível celular interno e/ou externo) e os fatores de stress (choque osmótico, desidratação do meio de cultura, stress hídrico, metais pesados, alterações do pH do meio de cultura, tratamentos de choque de calor ou frio, hipóxia, antibióticos, radiação ultravioleta e tratamentos mecânicos ou químicos) (Yu *et al.*, 2001; Ikeda-Iwai *et al.*, 2003; Aoshima, 2005; Fehér, 2005; Patnaik *et al.*, 2005; Karami *et al.*, 2006; Begun *et al.*, 2007; Potters *et al.*, 2007; Lincy *et al.*, 2009). Na cenoura (*Daucus carota*), uma planta modelo para a ES, tratamento de stress no meio livre de reguladores de crescimento induz ES na presença de diferentes produtos químicos, tais como 0,7 M de sacarose, 0,3 M de NaCl ou 0,6 mM de CdCl (Kamada *et al.*, 1993). Um pré-tratamento a frio (2°C) por 3 dias em carvão ativado e na presença de concentrações mínimas de Ca²⁺ é necessário para induzir tecido embrionário branco mucilaginoso derivado de brotos em ápices de *Pinus patula* maduro (Malabadi *et al.*, 2006). Mais recentemente Lincy *et al.* (2009) verificaram que um período de stress causado por desidratação foi favorável para induzir ES em calos de gengibre (*Zingiber officinale*). Em *Arabidopsis*, o stress foi o fator mais importante no controle da indução de embriões somáticos. Stress osmótico, metais pesados e desidratação induz a formação de embriões somáticos (Ikeda-

Iwai *et al.*, 2003) nesta espécie modelo. Estes autores concluíram que a duração do tratamento de stress era o fator mais importante e que o tratamento do stress ótimo diferiu entre diferentes indutores de stress. Pelo menos cinco fatores críticos interativos foram reconhecidos, incluindo a origem do tecido, a fase de desenvolvimento da origem da planta, origem do stress, stress devido a concentração química e duração do tratamento de stress. Em *Lycium barbatum*, Kairong *et al.* (2002) estabeleceu uma correlação entre o tratamento com peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o efeito de indução de ES. H_2O_2 , gerado por vários estímulos ambientais e de desenvolvimento, pode atuar como uma molécula sinalizadora que regula o desenvolvimento das plantas, adaptação ao stress e morte celular programada (Apele *et al.*, 2004). Assim, H_2O_2 , atua como um segundo "mensageiro" celular capaz de induzir a expressão génica e síntese proteica, e promover a ES (Zavattieri *et al.*, 2010).

1.7. Estabilidade genética do processo de ES

As gimnospérmicas têm entre os mais complexos e grandes genomas de qualquer organismo vivo. O género *Pinus* tem sido alvo de inúmeras investigações para determinar o tamanho do seu genoma estimado por citometria de fluxo. Os pinheiros são exclusivamente diploides com $2n=24$ cromossomas e são caracterizados por um genoma de grande tamanho que varia entre 18,000 e 40,000 Mbp (conteúdo C1) (Grotkopp *et al.*, 2004; Marum *et al.*, 2009 e Morse *et al.*, 2009).

O interesse no tamanho do genoma em *Pinus* e outras coníferas foi obtido pela sua importância económica e também devido a observações de variações intraespecíficas entre diferentes espécies de *Pinus*. Uma possível causa destas variações é a poliploidia, contudo é muito rara em Pinaceae em geral e ausente em populações de *Pinus*. No entanto, períodos de expansão de retrotransposões e não de poliploidia podem ser de principal importância na explicação da variação do tamanho do genoma entre espécies de *Pinus* (Morse *et al.*, 2009).

A ES pode conduzir à instabilidade genética de células embriogénicas. Como as mutações espontâneas raramente oferecem características valiosas para programas de melhoramento, a mutação é muitas vezes em programas de

produção em larga escala considerada como um aspecto negativo do processo e, por conseguinte, as plantas regeneradas, devem ser monitorizadas tanto ao nível cromossômico como molecular, de preferência, em combinação com o desempenho fenotípico da planta no campo (Pinto *et al.*, 2007).

O processo de ES apresenta divisões celulares intensas e as células sofrem alterações funcionais e fisiológicas graves (Pinto *et al.*, 2007). Devido a estes aspetos no processo de ES existe variação somaclonal que muitas vezes é hereditária e envolve mudanças nos genomas nucleares e citoplasmáticos, e as suas particularidades podem ser de natureza genética e/ou epigenética (Henry, 1998; Gaj, 2004).

Alterações genéticas incluem poliploidia, aneuploidia, mutações pontuais e novas inserções de (retro) transposições (como referido anteriormente). Alterações epigenéticas não implicam alterações da sequência do DNA, mas são o resultado de alterações na metilação do DNA, alterações nas modificações das histonas, ou uma combinação destes mecanismos epigenéticos que modificam a expressão do gene. Eles são, em teoria, temporários (plantas 'revertem' para o fenótipo normal), mas são, por vezes, assumidos assim na descendência (Klerk, 1990; Smulders, 2005, 2011).

A incidência de variação somaclonal em ES é influenciada pelo genótipo, pelo nível de ploidia (poliploides dando origem a uma maior variação), a origem do explante, a idade e procedimento da cultura (Bednarek *et al.*, 2007) e também pelo facto de que as células sofrem divisão celular intensa e múltipla, que são propensas a erros de replicação. Além disso, as condições de stress e os reguladores de crescimento pode influenciar diretamente o perfil de expressão do gene (Chugh *et al.*, 2002; Che *et al.*, 2006), como consequência, por exemplo, da modificação na metilação do DNA (promove a ativação de transposições e retrotransposições, que podem ativar ou silenciar genes), alterações cromossômicas e mutações pontuais (Kaeppeler *et al.*, 2000; Smulders, 2005). Vários estudos têm demonstrado que a variação somaclonal pode ser avaliada através da análise do fenótipo, número e estrutura dos cromossomas, proteínas ou a avaliação direta de DNA (Klerk, 1990).

Os dados da literatura relacionados com o estado genético de embriões somáticos são escassos. No entanto, publicações referem que embriões somáticos de sobreiro (Loureiro *et al.*, 2005) e bróculos (Yang *et al.*, 2010) apresentavam o mesmo conteúdo de DNA que plantas-mãe. Em *Pinus pinaster*, não houve diferença no tamanho do genoma de embriões somáticos e zigóticos (Marum *et al.*, 2009). Embriões zigóticos de *Eucalyptus globulus* possuíam o mesmo conteúdo de DNA que embriões somáticos (Pinto *et al.*, 2004).

1.8. Embriogénese somática em *Pinus* – state of art

A ES de coníferas tornou-se parte integrante de muitas estratégias de melhoramento. Com a sua capacidade para a preservação a longo prazo, é visto como sendo a técnica com mais potencial para acelerar a seleção e utilização operacional de genótipos de elevado valor económico. No entanto, as espécies de pinheiros são muitas vezes mais recalcitrantes para obtenção de ES (Bonga *et al.*, 2010), como referido anteriormente no ponto 1.6.1.

Esta secção pretende resumir conclusões relevantes relacionadas com a ES em *Pinus*. Existem várias publicações sobre indução de ES em *Pinus*, resumidas na tabela 1. Todo o processo de ES tem sido bem sucedido na produção de plântulas em várias espécies. Estas incluem as espécies *Pinus banksiana* (Aderkas *et al.*, 2005, Park *et al.*, 2006), *P. monticola* (Percy *et al.*, 2000), *P. pinaster* (Lelu *et al.*, 1999, Miguel *et al.*, 2004), *P. radiata* (Aquea *et al.*, 2008), *P. strobus* (Park *et al.*, 2006), *P. sylvestris* (Keinonen-Mettälä *et al.*, 1996, Häggman *et al.*, 1999, Lelu *et al.*, 1999, Aronen *et al.*, 2009) e *P. taeda* (Pullman *et al.*, 2003a).

A investigação realizada nas últimas duas décadas prova que a ES em *Pinus* é iniciada essencialmente em embriões zigóticos imaturos. Existe uma limitação para a iniciação de ES com embriões zigóticos maduros (Klimaszewska *et al.*, 2007). Contudo foi induzida em várias espécies de *Pinus*: *P. strobus* (Garin *et al.* 1998), *P. nigra* (Radojevic *et al.* 1998), *P. taeda* (Tang *et al.* 2001), *P. kesiya* (Malabadi *et al.* 2005), *P. roxburghii* (Malabadi *et al.* 2007) e *P. caribaea* (Malabadi *et al.* 2011).

A primeira publicação de indução de ES em *P. elliotii* surgiu em 1989 (Jain *et al.*, 1989) recorrendo a embriões zigóticos imaturos em meio DCR. A partir daí vários progressos foram feitos por Liao (1993), Newton *et al.* (1993), Marek-Swize (1994), Newton *et al.* (1995), Liao (1995) e por Tang (1997) a partir de embriões zigóticos imaturos. A mais recente publicação de ES em *P. elliotii* foi realizada por Newton *et al.* em 2005 onde foram igualmente utilizados embriões zigóticos imaturos originando plantas (fase de aclimatização).

Tabela nº1: Sumário da indução de ES no género *Pinus*

Referências (por ano)	Espécies	Tipo de explante	Meio de cultura	Reguladores crescimento
Radojevic <i>et al.</i> 1998	<i>P. nigra</i>	EZ maduros	DCR	NAA e BAP
Garin <i>et al.</i> 1998	<i>P. strobus</i>	EZ maduros	HLM-PB	
Percy <i>et al.</i> , 2000	<i>P. monticola</i>	EZ imaturos	mLV	2,4-D e BAP
Tang <i>et al.</i> 2001	<i>P. taeda</i>	EZ maduros	LOB	2,4-D e BAP
Miguel <i>et al.</i> 2004	<i>P. pinaster</i>	EZ imaturos	DCR	2,4-D e BAP
Malabadi <i>et al.</i> 2005	<i>P. kesiya</i>	EZ maduros	MSG	TRIA e 2,4-D
Salajova <i>et al.</i> 2005	<i>P. nigra</i>	EZ imaturos	DCR	2,4-D e BAP
Walter <i>et al.</i> 2005	<i>P. radiata</i>	EZ imaturos	EDM6	2,4-D e BAP
Newton <i>et al.</i> 2005	<i>P. elliotii</i>	EZ imaturos	LP	2,4-D e BAP
Park <i>et al.</i> 2006	<i>P. banksiana</i>	EZ imaturos	mLV	CPPU
Park <i>et al.</i> 2006	<i>P. strobus</i>	EZ imaturos	mLV	2,4-D
Malabadi <i>et al.</i> 2007	<i>P. roxburghii</i>	Cotilédones	DCR	TRIA, 2,4-D e NAA
Malabadi <i>et al.</i> 2007	<i>P. roxburghii</i>	EZ maduros	LM	2,4-D e TRIA
Zhang <i>et al.</i> 2007	<i>P. bungeana</i>	EZ imaturos	DCR	2,4-D e BAP
Stojičić <i>et al.</i> 2007	<i>P. heldreichii</i>	EZ imaturos	GD	2,4-D e BAP
Aquea <i>et al.</i> , 2008	<i>P. radiata</i>	EZ imaturos	QL	2,4-D e BAP
Aronen <i>et al.</i> , 2009	<i>P. sylvestris</i>	EZ imaturos	DCR	2,4-D e BAP
Pullman <i>et al.</i> 2003a	<i>P. taeda</i>	EZ imaturos	½ P6 (modificado)	BAP, cinetina e NAA

Chavez <i>et al.</i> 2011	<i>P. oocarpa</i>	EZ imaturos	PO	BAP, cinetina e NAA
Montalban <i>et al.</i> 2011	<i>P. radiata</i>	EZ imaturos	EDM	2,4-D e BAP
Malabadi <i>et al.</i> 2011	<i>P. caribaea</i>	EZ maduros	MSG	24-epiBr e 2,4-D
Shin <i>et al.</i> 2012	<i>P. rígida</i> x <i>P. taeda</i>	EZ imaturos	P6	2,4-D e BAP
Hosoi <i>et al.</i> 2012	<i>P. luchuensis</i>	EZ imaturos	EM (modificado)	2,4-D e BAP
Humáñez <i>et al.</i> 2012	<i>P. pinaster</i>	EZ imaturos	DCR	2,4-D e BAP

1.9. Objetivos

Dada a importância comercial de *P. elliotii* e do híbrido *P. elliotii* x *P. caribaea*, e a necessidade de desenvolver uma bateria de protocolos de cultura *in vitro* para aplicação em programas de (micro)propagação e em programas de investigação em geral (eg, fisiologia, biologia molecular, etc), estabeleceu-se como objetivo principal estudar o efeito de vários fatores (endógenos e exógenos) na indução de: a) tecido caloso (importante em estudos fundamentais de fisiologia, manutenção de germoplasma, morfogénese, etc); b) tecido caloso embriogénico (importante para a regeneração de plantas por ES, estudos de criopreservação, etc). Para alcançar este objetivo, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Comparar dois protocolos de desinfecção de sementes de forma a contornar este passo crucial na iniciação de qualquer cultura *in vitro*.
- Avaliar o efeito de dois tipos de explantes na indução de tecido caloso: cotilédones e EZM.
- Desenvolver um protocolo de indução de ES tendo em conta diferentes fatores de natureza física e química enquanto agentes indutores de ES: reguladores de crescimento, fontes de carbono, temperatura, ácido salicílico, peróxido de hidrogénio, prolina e putrescina.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Durante este trabalho usamos sementes maduras de *P. elliotti* (PE) e híbrido *P. elliotti* x *P. caribaea* originárias da América do Sul, de onde se obteve os EZM e os cotilédones.

2.1.1. Desinfecção do material vegetal

O objetivo desta etapa foi comparar dois protocolos de desinfecção de sementes de forma a contornar as elevadas contaminações que existem na propagação *in vitro* de coníferas. Os protocolos seguintes, segundo a literatura, são usados para o género *Pinus* (ex. *P. oocarpa* (Chavez, 2011) e *P. nigra* (Radojevic, 1998)) e para este tipo de explante o que é uma mais-valia para que os agentes químicos usados sejam eficazes contra os microorganismos e que não interfiram na viabilidade da cultura. Descrevem-se a seguir os principais passos da estratégia de desinfecção:

2.1.1.1. Desinfecção com hipoclorito de sódio

- As sementes foram passadas por água corrente, de seguida lavadas em água com detergente e foram realizadas 3 a 4 passagens por água.
- Imersão das sementes em etanol diluído durante 3 minutos.
- Imersão numa solução de hipoclorito de sódio diluído com detergente, durante 15 minutos com agitação.
- Transferência das sementes para a câmara de fluxo laminar e lavadas 3 vezes com água estéril.

2.1.1.2. Desinfecção com peróxido de hidrogénio

- Imersão em etanol e peróxido de hidrogénio durante 15 minutos com agitação.
- Transferência para a camara de fluxo laminar
- Lavagem das sementes com água estéril, no mínimo 3 vezes.

2.2. Indução de tecido caloso

2.2.1. Experiencia I

Nesta experiência recorreremos a EZM e cotilédones do PE e híbrido obtidos de sementes desinfetadas com peróxido de hidrogénio (para obtenção de EZM) e hipoclorito de sódio (para obtenção de cotilédones)..

Os cotilédones utilizados foram recolhidos de plântulas com cerca de um mês de idade, germinadas *in vitro* em meio de germinação. Este consistia em meio MS a ¼ de força contendo 8 g/L de agar e 15 g/L de sacarose. O pH do meio foi aferido a 5,8 com NaOH ou HCl antes de ser adicionado o agar. O meio foi esterilizado por autoclavagem a 121°C por 20 min. Os frascos foram selados com parafilme e as culturas mantidas à luz (90 µmol/m²/s) a cerca de 22°C +/- 2°C.

Os EZM, extraídos do interior da semente, e os cotilédones foram incubados em meios de indução contendo 8 g/L de agar e 30 g/L de sacarose. Foram preparados 3 meios distintos, com base no meio Murashige & Skoog (MS) (Murashige *et al.* 1962, ver constituição na tabela 2) suplementados com 2,4-D e NAA diluídos em NaOH e TDZ diluído em DMSO (dimetilsulfóxido) (ver tabela 3). O pH do meio foi aferido a 5,8 com NaOH ou HCl antes de ser adicionado o agar. O meio foi esterilizado por autoclavagem a 121°C durante 20 min. O TDZ, 2,4-D e NAA são esterilizados por filtração e adicionados ao meio depois deste arrefecer abaixo dos 50°C.

Inocularam-se dez explantes por placa de Petri. Foram usados 20 explantes de cada espécie (PE e híbrido) por tratamento. As placas de Petri foram seladas com parafilme e as culturas mantidas no escuro a cerca de 22°C +/- 2°C durante 2 semanas.

Tabela nº 2 : Composição do meio de cultura Murashige e Skoog (1962).

Macronutrientes	(mg/L)
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
Micronutrientes	(mg/L)
KI	0,83
H_3BO_3	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{Na}_2\text{.EDTA}$	37,5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
Vitaminas e outros compostos orgânicos	(mg/L)
Mio-inositol	100
Ácido nicotínico	0,5
Piridoxina	0,5
HCl	0,1
HCl tiamina	2,0

Tabela nº 3: Meio de indução de *callus* a partir de EZM e cotilédones

Tratamento	Meio base	Regulador de crescimento	Fonte de Carbono	Agente solidificante
T1	MS	2 mg/L 2,4-D	30 g/L Sacarose	8 g/L Agar
T2	MS	2 mg/L NAA	30 g/L Sacarose	8 g/L Agar
T3	MS	0,02 mg/L TDZ	30 g/L Sacarose	8 g/L Agar

Para avaliação da capacidade de expressão de ES, os explantes em que foi identificada produção de *callus* foram transferidos para meio MS sem reguladores de crescimento, meio de expressão (tabela 4). As culturas foram mantidas no escuro a cerca de 22°C durante 3 semanas e foram registadas observações.

Tabela 4: Meio de expressão de ES para *calli* formados a partir de explantes de cotilédones e EZM

Meio base	Regulador de crescimento	Fonte de Carbono	Agente solidificante
MS	-	30 g/L Sacarose	8 g/L Agar

2.2.1.1. Registo de dados

Em cada uma das etapas em cima descritas foram registados os seguintes parâmetros:

- % de explantes com infeções: os explantes foram supervisionados frequentemente durante as primeiras semanas para assegurar que não existem contaminações.
- % de explantes com *callus*: os explantes são observados e é registada a presença do *callus*.
- Qualidade do *callus*: no final de cada etapa é registada a qualidade do callus (cor e aspeto).

2.2.2. Experiência II

Nesta segunda experiência recorreu-se apenas a EZM do híbrido desinfetados de acordo com os passos descritos no ponto 2.1.1.2. Antes da inoculação no meio de cultura, foi feita uma incisão do endosperma da semente para retirar o EZM.

Os EZM foram incubados em meio MS suplementado com 2 g/L de gelrite e o pH foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl antes daquela ser adicionada. Diferentes

fontes de carbono (sacarose e maltose), combinações de reguladores de crescimento e agentes indutores de stress foram testados (T1-T10; tabela 5).

Várias combinações de reguladores de crescimento foram testadas inicialmente, nomeadamente 2,4-D + BAP e 2,4-D + 24-epiBr e foram também comparadas diferentes fontes de carbono, sacarose e maltose, nos dois meios (T1-T4; tabela 5). Ambos os meios foram suplementados com glutamina (diluída em HCl), caseína hidrolisada (diluída em água), mio-inositol (diluído em água), ácido amino-benzoico (diluído em etanol) e ácido fólico (diluído em HCl). Foram preparadas soluções *stock* de 2,4-D, e BAP diluídas em NaOH e 24-epiBr diluído em etanol. O meio foi esterilizado por autoclavagem a 121°C durante 20 min. A glutamina, caseína hidrolisada, ácido amino-benzoico, 24-epiBr, BAP e 2,4-D são esterilizados por filtração e adicionados ao meio depois deste arrefecer abaixo dos 50°C.

Em T5 e T6 (tabela 4), as sementes foram submetidas a um pré-tratamento com calor e frio, respetivamente, ou seja, foram sujeitas a condições de temperatura elevadas, em estufa (80°C), e a temperaturas baixas, no congelador (-15°C) durante 24h e posteriormente desinfetadas de acordo com o descrito anteriormente (ponto 2.1.1.2). Os EZM retirados das sementes foram incubados em meio MS suplementado com 2,4-D.

Nos seguintes tratamentos (T7-T10; tabela 5), todos os meios foram suplementados com a combinação de reguladores de crescimento 2,4-D + 24-epiBr e foi usada maltose como fonte de carbono. Foram também adicionados aos meios diferentes agentes associados a stress, tais como: ácido salicílico (AS) (diluído em etanol); a prolina (diluída em água) e o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) diretamente adicionados ao meio; também a putrescina (esterilizada por filtração) foi adicionada ao meio depois deste ser autoclavado.

Tabela nº5: Meio de indução de *callus* e/ou *callus* embriogénico a partir de EZM em diferentes combinações de reguladores de crescimento e diferentes fatores de stress.

Trat.	Meio base	Outros Compostos	Regulador Crescimento	Fonte Carbono	Agente Solidificante	Fatores Stress
T1	MS	1 g/L L-Glutamina 1 g/L Caseína hidrosilada 0,5 g/L Mio-inositol 0,2 g/L Ácido amino-benzoico 0,1 g/L Ácido fólico	2,4 mg/L 2,4-D 1 mg/L 24-epiBr	30 g/L Sacarose	2 g/L Gelrite	
T2	MS	1 g/L L-Glutamina 1 g/L Caseína hidrosilada 0,5 g/L Mio-inositol 0,2 g/L Ácido amino-benzoico 0,1 g/L Ácido fólico	2,4 mg/L 2,4-D 1 mg/L 24-epiBr	30 g/L Maltose	2 g/L Gelrite	
T3	MS	1 g/L L-Glutamina 1 g/L Caseína hidrosilada 0,5 g/L Mio-inositol 0,2 g/L Ácido amino-benzoico 0,1 g/L Ácido fólico	8 mg/L 2,4-D 4 mg/L BAP	30 g/L Sacarose	2 g/L Gelrite	
T4	MS	1 g/L L-Glutamina 1 g/L Caseína hidrosilada 0,5 g/L Mio-inositol 0,2 g/L Ácido amino-benzoico 0,1 g/L Ácido fólico	8 mg/L 2,4-D 4 mg/L BAP	30 g/L Maltose	2 g/L Gelrite	
T5	MS		8 mg/L 2,4-D	30 g/L Maltose	2 g/L Gelrite	Calor (80°C)
T6	MS		8 mg/L 2,4-D	30 g/L Maltose	2 g/L Gelrite	Frio (-15°C)
T7	MS		8 mg/L 2,4-D 1 mg/L 24-epiBr	30 g/L Maltose	2 g/L Gelrite	1 mg/L AS

T8	MS		8 mg/L 2,4-D 1 mg/L 24- epiBr	30 g/L Maltose	2 g/L Gelrite	250 mg/L Prolina
T9	MS		8 mg/L 2,4-D 1 mg/L 24- epiBr	30 g/L Maltose	2 g/L Gelrite	9 µl/L H ₂ O ₂
T10	MS		8 mg/L 2,4-D 1 mg/L 24- epiBr	30 g/L Maltose	2 g/L Gelrite	2 mg/L Putrescina

(2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético; 24-epiBr: 24-epibrassinolide; BAP: benzilaminopurina; AS: ácido salicílico; H₂O₂: peróxido de hidrogénio)

Para se iniciar a indução de ES incubaram-se 5 explantes em cada placa de Petri. Foram usados 20 explantes do híbrido por tratamento. As culturas foram mantidas no escuro a cerca de 22°C +/- 2°C durante 7 semanas.

Passadas 7 semanas em meio de indução, o *callus* foi repicado para o meio de expressão, meio MS sem reguladores de crescimento suplementado com carvão ativado (tabela 6). As culturas foram mantidas no escuro a cerca de 22°C +/- 2°C durante aproximadamente 6 semanas.

Tabela 6 : Meio de expressão de ES para *calli* formados de explantes de EZM

Meio Base	Outros Compostos	Regulador Crescimento	Fonte Carbono	Agente Solidificante
MS	10 g/L Carvão ativado	-	30 g/L Sacarose	3 g/L Gelrite

Passadas 6 semanas em meio de expressão (tabela 6), o *callus* foi repicado para meio de maturação, descrito por vários autores como fase importante na maturação de ES. O meio de maturação usado está descrito na tabela 7. O ABA é diluído em etanol, esterilizado por filtração e adicionado ao meio depois deste arrefecer abaixo dos 50°C. As culturas foram mantidas no escuro a cerca de 22°C +/- 2°C durante 7 semanas e após esse tempo observações visuais foram feitas.

Tabela 7: Meio de Maturação para *calli* formados a partir de explantes de EZM

Meio Base	Regulador Crescimento	Fonte Carbono	Agente Solidificante
MS	0,032 g/L ABA	61,61 g/L Maltose	10 g/L Gelrite

2.2.2.1. Análises histológicas

Para confirmar se o *callus* é de natureza embriogénica, este é corado com carmim acético a 1%. Este tipo de marcação é empregue devido ao fato do carmim acético promover uma marcação de observação rápida entre tecido embriogénico e não-embriogénico. Isto é devido ao fato do carmim acético corar os núcleos das células

Retira-se uma pequena quantidade de *callus* que é submerso em poucas gotas de carmim acético a 1% e aquecido durante uns segundos e observa-se e fotografa-se ao microscópio ótico com uma camara digital integrada nas ampliações 10x e 40x.

Esta amostragem foi realizada na experiência II antes do *callus* ser transferido para meio de expressão com o objetivo de perceber se o tecido é embriogénico.

2.2.2.2. Registo de dados

Em cada uma das etapas em cima descritas foram registados os seguintes parâmetros:

- % de explantes com infeções: os explantes foram supervisionados frequentemente durante as primeiras semanas para assegurar que não existem contaminações
- % de explantes com *callus*: os explantes são observados e é registada a presença de *callus*.

- Quantidade/ tamanho de *callus* produzido por explante: através de uma escala (de 0 a 9, em que 0 significa ausência de *callus*; 1: muito pequeno; 3: pequeno; 5: médio; 7: grande e 9 significa muito grande)
- Qualidade do *callus*: no final de cada etapa é registada a qualidade do *callus* (cor e aspeto) e na etapa inicial é feita uma análise histológica para avaliar a sua competência para originar tecido embriogénico

RESULTADOS

3.1. Comparação de protocolos de desinfecção de sementes

Neste trabalho foram comparados dois tipos de desinfecção, por peróxido de hidrogénio e por hipoclorito de sódio. Cerca de 2 semanas após a inoculação das sementes verificou-se que a desinfecção com peróxido de hidrogénio foi mais eficiente pois não foi registada qualquer tipo de contaminação. No entanto a taxa de germinação quando as sementes são submetidas à desinfecção com hipoclorito de sódio é superior (tabela 8).

Tabela nº8: Comparação de protocolos de desinfecção de sementes

Tipo Desinfecção	Espécie	Data Início Ensaio	Data Observação	Germinações (%)	Contaminações (%)
Peróxido de hidrogénio	<i>P. elliotii</i>	23/11/12	7/12/12	13%	0
	Híbrido	26/11/12	7/12/12	0	0
Hipoclorito de sódio	<i>P. elliotii</i>	23/11/12	7/12/12	7%	67%
	Híbrido	26/11/12	7/12/12	40%	0

3.2. Indução de tecido caloso

3.2.1. Experiência I

Resultados obtidos com EZM

Nesta experiência a percentagem de infeções foi baixa (20%), sendo apenas verificadas contaminações em meio de expressão em EZM de *P. elliotii* (PE) (induzidos em meio MS suplementado com NAA).

Cerca de 2 semanas após a iniciação de ES, a proliferação de *callus* foi observada em todos os tratamentos com EZM em PE e no híbrido. A percentagem de indução de *callus* em PE é maior em meio com 2,4-D (85%) comparativamente aos meios com NAA (55%) e TDZ (15%) (Figura 6). No entanto, no híbrido, a percentagem de indução de *callus* é menor em meios com

2,4-D (75%) e NAA (35%), e em meio com TDZ a percentagem é igual à do PE (15%) (Figura 6).

Ao fim de 5 semanas da passagem do *callus* para meio de expressão verificou-se um aumento da proliferação de *callus* em meios com 2,4-D (90%) em EZM de PE e do híbrido. Em meio com TDZ verificou-se apenas um aumento na proliferação de *callus* no híbrido (30%) enquanto no PE manteve-se a mesma percentagem obtida anteriormente. Relativamente ao meio com NAA, na figura 6 não está visível a barra do PE pois houve contaminação neste meio. No entanto, no híbrido, houve um ligeiro aumento da proliferação de *callus* (45%) (Figura 6). A concentração de reguladores de crescimento mais eficiente em EZM foi 2 mg/l de 2,4-D com uma taxa de indução de *calli* de 90% em PE e no híbrido (Figura 6).

Resultados obtidos com cotilédones

Nos cotilédones apenas existe proliferação de *callus* em PE quando o meio é suplementado com 2,4-D (45%). Nos restantes meios, NAA e TDZ, não houve proliferação de *callus* nas primeiras 2 semanas. No entanto, no híbrido, foi observada proliferação de *callus* em meios com 2,4-D (55%) e NAA (55%), enquanto em meio com TDZ não houve proliferação de *callus* durante as primeiras 2 semanas (Figura 6).

Ao fim de 5 semanas, ou seja 3 semanas após a transferência do *callus* para meio de expressão, a proliferação de *callus* foi observada em todos os tratamentos em PE e no híbrido. A percentagem de produção de *callus* em PE em meios com 2,4-D, NAA e TDZ foi de 80%, 85% e 30%, respetivamente. No entanto, no híbrido a percentagem de indução de *callus* foi mais elevada em todos os tratamentos, nomeadamente em 2,4-D e NAA (100%) e em TDZ (50%) (Figura 6).

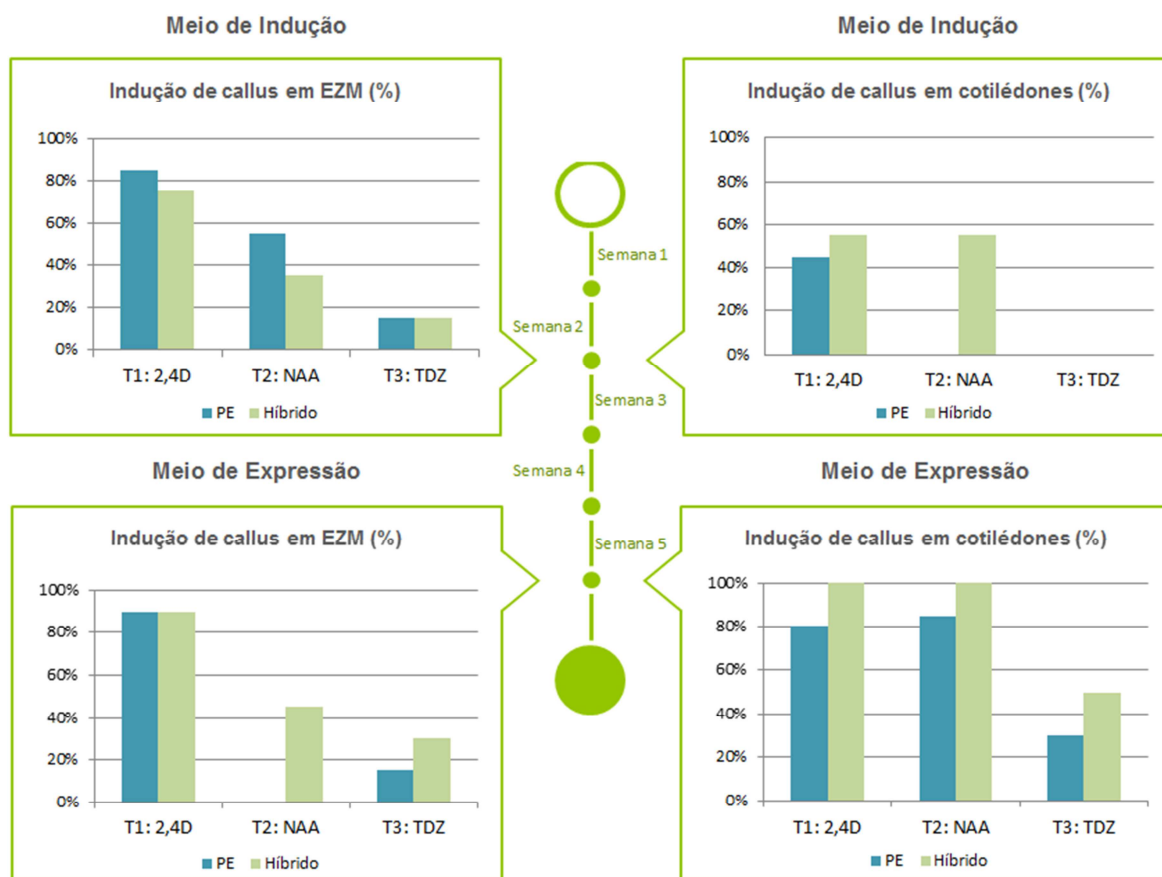


Figura nº 6: Percentagem de produção de *callus* em EZM e cotilédones em meios suplementados com 2,4-D, NAA e TDZ.

Qualidade do *callus*

Relativamente à qualidade do *callus* produzido, podemos dizer que o *callus* tinha, maioritariamente, um aspeto compacto e de cor creme em todos os tratamentos em PE e no híbrido (Figura 7A). Ao contrário do que acontece habitualmente em outras espécies, no tratamento com TDZ, houve pouca produção de *callus* e obteve-se a germinação dos EZM tanto em PE como no híbrido (Figura 7B). Em meio de expressão foi registado um escurecimento do tecido caloso resultando na morte do tecido (fenolização), não havendo posteriormente proliferação de *callus* nem produção de embriões somáticos.

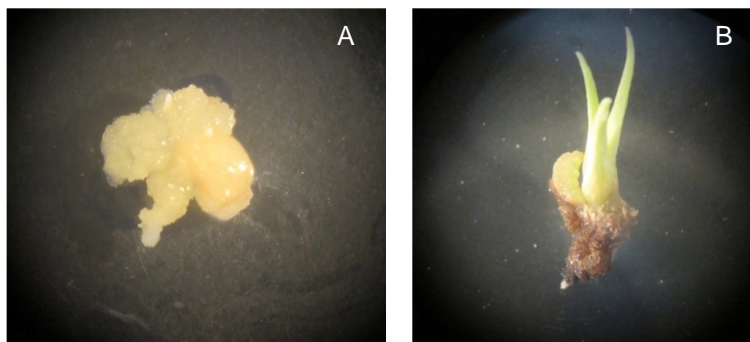


Figura nº 7: (A) *Callus* em meio suplementado com NAA em EZM de *P. elliottii*. (B) Germinação dos EZM de *P. elliottii* em meio suplementado com TDZ.

A qualidade do *callus* produzido, passadas 2 semanas da iniciação da ES, nos cotilédones revelava, tal como nos EZM, um aspeto compacto e de cor creme em todos os tratamentos em PE e no híbrido (Figura 8). Em meio de expressão foi registado um escurecimento do tecido caloso resultando na morte do tecido (fenolização), não havendo posteriormente proliferação de *callus* nem produção de embriões somáticos.



Figura nº 8: *Callus* em meio suplementado com 2,4--D em cotilédones de *P. elliottii*.

3.2.2. Experiência II

Nesta experiência recorreremos apenas a EZM do híbrido devido á limitação de tempo para realizar a parte prática conducente a esta tese. Além disso, esta escolha prende-se também com o facto de o híbrido apresentar características comerciais potencialmente mais interessantes que o PE. A proliferação de *callus* foi observada em todos os meios com EZM do híbrido após 7 semanas em meio de indução. Nesta experiência foi também observada e registada a quantidade de *callus* produzida (numa escala de 0 a 9) com o objetivo de revelar qual a combinação de reguladores de crescimento ou agentes químicos e físicos relacionados com o stress onde o *callus* atingiu maior tamanho.

Efeito dos reguladores de crescimento

A combinação de reguladores de crescimento 2,4-D + 24-epiBr (T1-T2) resultou em 10 % de explantes com *calli*, e em 2,4-D + BAP (T3-T4) representou 30 % (figura 9).

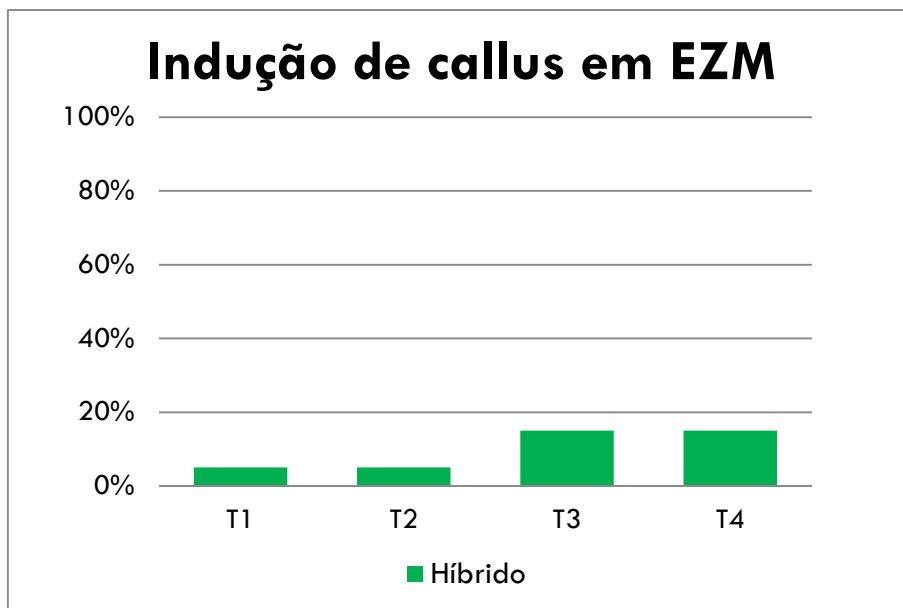


Figura nº 9: Percentagem de indução de *callus* em EZM em meios suplementados com T1: 2,4-D + 24-epiBr com sacarose; T2: 2,4-D + 24-epiBr com maltose; T3: 2,4-D + BAP com sacarose; T4: 2,4-D + BAP com maltose.

Efeito das fontes de carbono

Quando a sacarose (T1 e T3) e maltose (T2 e T4) foram usadas como fontes de carbono a percentagem de indução de *callus* foi 20% em meio suplementado com 2,4-D + 24-epiBr e em meio com 2,4-D + BAP (Figura 9), ou seja, não houve diferenças na produção de *callus*. Contudo nos restantes tratamentos foi utilizada somente a maltose (T5-T10; tabela 4), devido a esta ser usada em *Pinus* com resultados mais eficazes (de acordo com a bibliografia).

Efeito da temperatura

No que diz respeito ao efeito da temperatura, o frio induziu *callus* em 100% dos explantes contrariamente ao calor que apenas produziu 5 % (Figura 10).

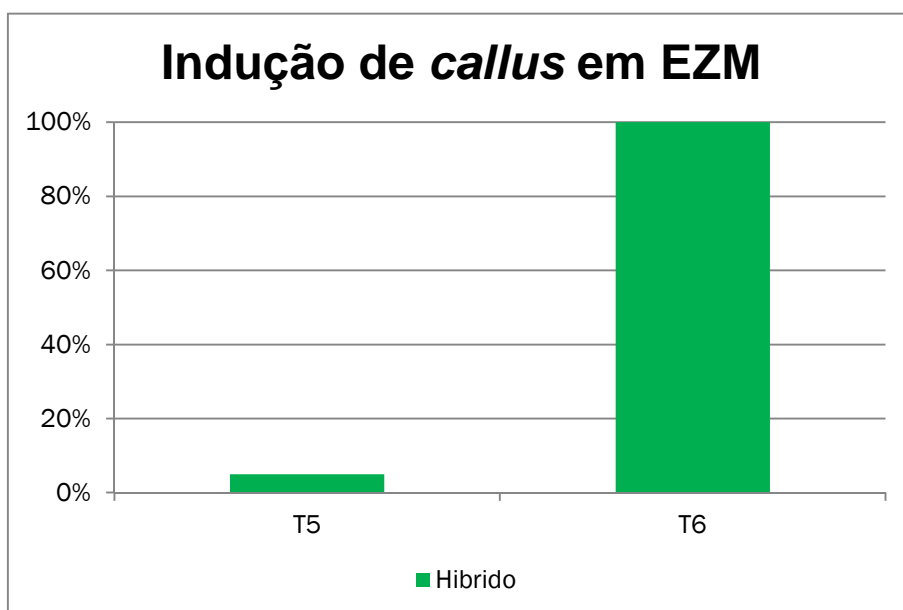


Figura nº 10: Percentagem de indução de *callus* em EZM pré-tratados com diferentes choques térmicos (calor (T5) e frio (T6)) ao fim de 7 semanas em meio MS suplementado com 2,4-D.

Efeito de outros agentes químicos (ácido salicílico; prolina; peróxido de hidrogénio e putrescina)

Em resposta ao AS, prolina, H₂O₂ e putrescina a percentagem de explantes com *callus* foi de 93%, 95%, 90% e 100%, respetivamente. A condição que levou a maior produção de *callus* foi a putrescina (figura 11). Contudo, no geral os

resultados foram bastante positivos relativamente ao controlo (meio com 2,4-D + 24-epiBr sem adição de agentes indutores de stress).

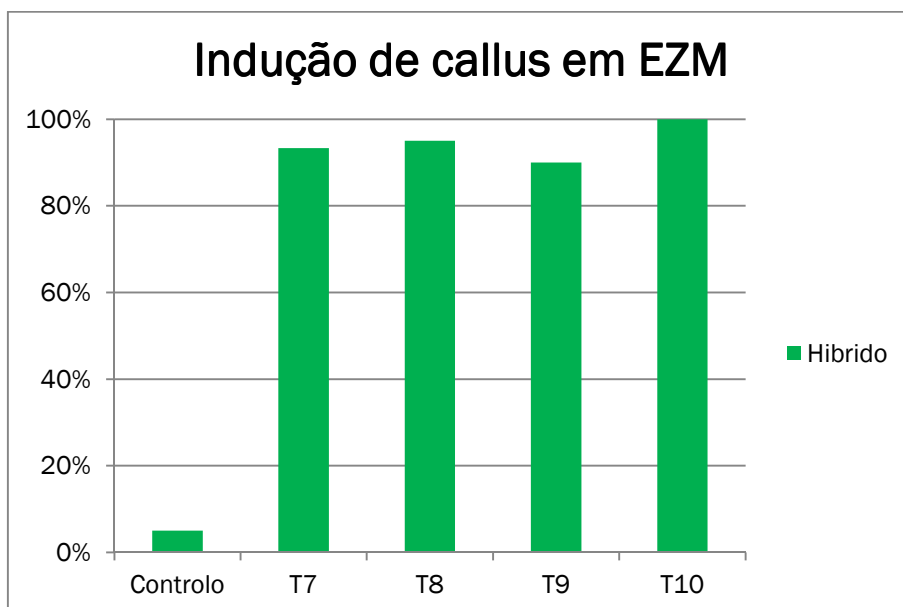


Figura nº 11: Percentagem de indução de *callus* em EZM em meios com T7: AS; T8: prolina; T9: H₂O₂ e T10: putrescina, suplementados com 2,4-D + 24-epiBr, em comparação com o controlo (meio suplementado com 2,4-D + 24-epiBr)

Em meio de expressão a produção de *callus* por explante não sofreu alteração e em meio de maturação também se manteve a percentagem de produção de *callus* por explante.

Qualidade do *callus*

O *callus* nestes meios apresentou-se maioritariamente escurecido com aspeto friável (figura 12A-J), passadas 7 semanas em meio de indução. No entanto, em meio de expressão e apenas em alguns tratamentos, como o frio, peróxido de hidrogénio e a putrescina o *callus* tinha uma cor transparente.

Em meio de maturação, como era de se esperar, o *callus* não evoluiu e manteve-se escurecido acabando por morrer por fenolização.

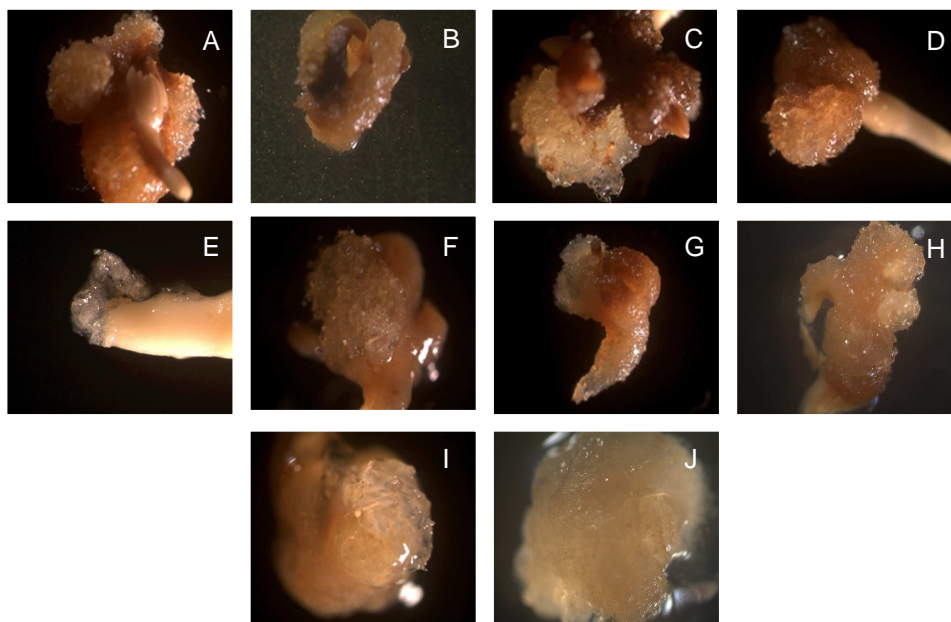


Figura nº 12: *Callus* produzido por EZM em meio com **(A)** 2,4-D + BAP e sacarose **(B)** 2,4-D + BAP e maltose **(C)** 2,4-D + 24-epiBr e sacarose **(D)** 2,4-D + 24-epiBr e maltose **(E)** 2,4-D com pré-tratamento em calor **(F)** 2,4-D com pré-tratamento com frio **(G)** AS **(H)** prolina **(I)** H₂O₂ **(J)** Putrescina

Tamanho do *callus*

Neste gráfico pode-se verificar que a ausência de *callus* é evidente nos primeiros 5 tratamentos (T1 a T5). Nos tratamentos com frio (T6) ácido salicílico (T7) e putrescina (T10) verifica-se maioritariamente um tamanho médio no *callus* produzido pelos explantes o que indica que estes tratamentos foram importantes na proliferação de *callus*. A prolina (T8) e o H₂O₂ (T9) apresentaram, maioritariamente, pouca produção de *callus* (figura 13).

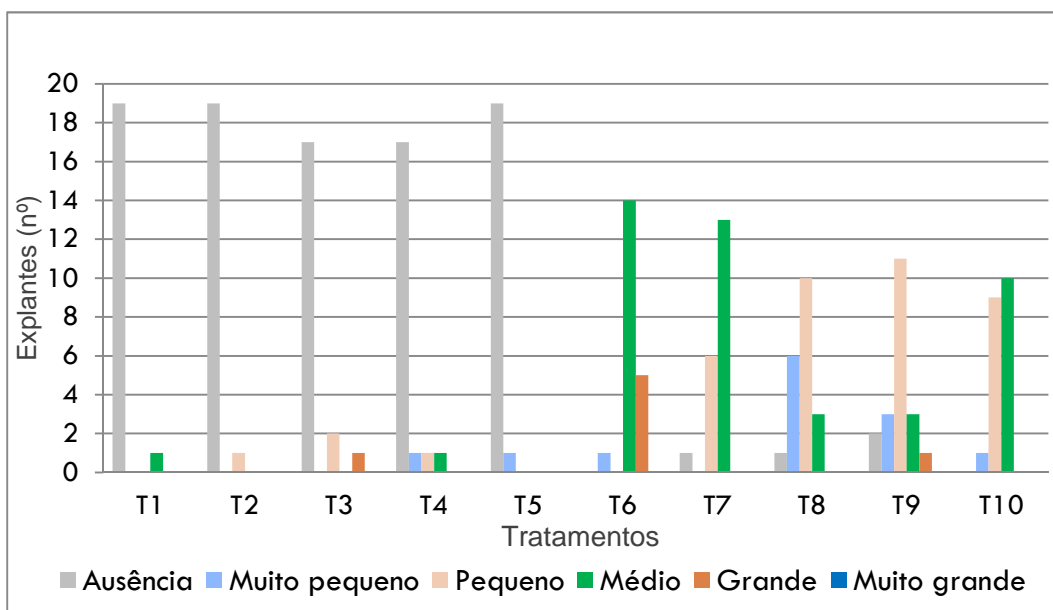


Figura nº 13: Tamanho do *callus* obtido em todos os tratamentos (T1-T10)

3.2.2.1. Análises histológicas

Foram observados *calli* com diversos tipos de aspeto. Alguns deles apresentavam cor creme ou estavam escurecidos, e tinham predominantemente um aspeto compacto, associados normalmente a tecidos não embriogénicos. O tecido potencialmente embriogénico é mais branco, translúcido e mucilaginoso na aparência, de células alongadas e quando corado com carmim acético mostra aglomerados celulares de células com citoplasma mais denso e com suspensores.

Foram realizadas análises histológicas com carmim acético em todos os tratamentos. No entanto, no tratamento com prolina os resultados obtidos demonstraram que a morfologia das células são idênticas à das células embriogénicas (células alongadas- suspensor) (figura 18) no género *Pinus*. Contudo, estas massas não mostraram qualquer evolução nas etapas seguintes.

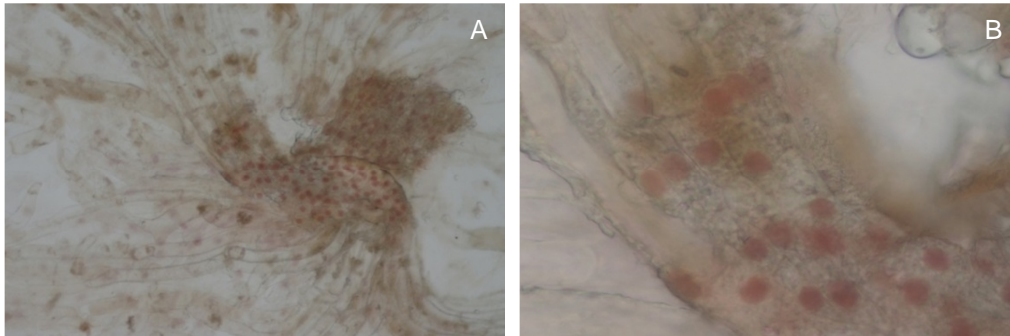


Figura nº 18: Preparação de carmim acético mostrando células muito alongadas e com características potencialmente interessantes no que se refere a potenciais características embriogénicas **(A)** callus em meio de indução com prolina (100x) e em **(B)** o mesmo que na imagem anterior (400x).

DISCUSSÃO

A iniciação de tecido caloso é condicionada pelo tipo e desenvolvimento do explante, genótipo, composição do meio de cultura, concentração dos reguladores de crescimento e agentes solidificantes. Também a indução de ES é afetada pelo estado do explante (eg, desenvolvimento dos embriões zigóticos), genótipo, composição do meio de cultura, tipo e combinação dos reguladores de crescimento e agentes solidificantes (Klimaszewska *et al.*, 2001; Pullman *et al.*, 2004). Esta influência foi igualmente observada em coníferas (que engloba espécies altamente recalcitrantes).

Dentro do género *Pinus* a taxa de sucesso de indução de ES depende muito das espécies. Em alguns casos o seu sucesso concentra-se na fase de indução de ES, limitando assim a capacidade de se obter linhas celulares para aplicação comercial (Park *et al.*, 2006; Hargreaves *et al.*, 2009). Isto é um problema, pois muitas espécies de *Pinus* são importantes economicamente, particularmente o *P. elliottii*.

Já tem sido descrita a produção de tecido caloso em *P. elliottii*, que foi inclusivamente usada para estudar a síntese proteica nessas células (Valluri *et al.*, 1988), ou para regenerar plantas por organogénese (Tang *et al.*, 2006). Não se encontram publicações de produção de tecido caloso no híbrido *P. elliottii* x *P. caribaea*.

Em resumo, neste trabalho em particular, um dos objetivos era avaliar a capacidade de obtenção de tecido caloso, a partir de EZM e cotilédones em *P. elliottii* e no híbrido. Os resultados foram positivos, havendo bastante variação em qualidade e quantidade de *callus* consoante os tratamentos realizados.

Outro objetivo era avaliar a capacidade de obtenção de ES, também em *P. elliottii* e no híbrido. Apesar dos resultados não serem indicativos da obtenção de tecido embriogénico, os resultados permitem ter uma ideia da resposta destes genótipos aos fatores estudados. Existe obviamente ainda um grande trabalho pela frente para a otimização desta técnica.

A contaminação é um dos principais problemas associados a ES de coníferas. No sentido de contornar este problema é muitas vezes necessário usar explantes jovens e saudáveis, preferencialmente os que crescem em ambientes controlados. Manter sempre uma técnica estéril e um ambiente limpo de trabalho. Assegurar que o material é esterilizado apropriadamente, bem como a camara de fluxo laminar (equipada com luz UV para permitir a sua esterilização previamente à utilização) (Davey *et al.*, 2010).

Uma etapa importante para se conseguir obter culturas para indução de *callus* e/ou ES, sem contaminações é a desinfecção do material vegetal. No sentido de contornar as elevadas contaminações que existem na propagação *in vitro* de coníferas foram comparados dois protocolos de desinfecção de sementes, através de dois agentes químicos: peróxido de hidrogénio e hipoclorito de sódio. Os resultados obtidos nesta comparação foram positivos para o protocolo com peróxido de hidrogénio no que se refere à percentagem de explantes com contaminações. No entanto, a percentagem de germinação foi mais elevada no protocolo com hipoclorito de sódio. Como o objetivo desta etapa é encontrar um compromisso entre a desinfecção do material vegetal e a viabilidade para indução de tecido caloso, o protocolo de desinfecção com peróxido de hidrogénio é o mais eficaz logo foi usado neste trabalho na desinfecção das sementes. Os protocolos usados neste trabalho são usados para o género *Pinus* (ex. *P. oocarpa* (Chavez, 2011) e *P. nigra* (Radojevic, 1998)) e para este tipo de explante, apoiando a escolha dos mesmos, pois revelaram-se eficazes contra os microorganismos e não interferiram na viabilidade da cultura.

Espécies do género *Picea* foram as primeiras coníferas nos quais se obteve sucesso na indução de ES em que foram usados EZM (Gupta *et al.*, 1986). Estes investigadores acreditavam que o tempo de desenvolvimento do embrião seria idêntico para todas as coníferas. Contudo, o protocolo usado para o género *Picea* não mostrou os mesmos resultados para outras gimnospérmicas tal como *Pinus*. Por exemplo, quando embriões de *Pinus* (de diferentes espécies) foram isolados de sementes maduras, a ES foi iniciada a frequências muito baixas ou nenhuma (Klimaszewska *et al.*, 2002). Até à data, a ES obtém-se maioritariamente de

embriões imaturos para grande parte das coníferas exceto *Picea* (Klimaszewska *et al.*, 2002). Contudo, apesar da dificuldade comprovada de se obter tecido embriogénico a partir de EZM dentro do género *Pinus*, neste estudo foram usados EZM de *P. elliottii* e do híbrido devido à facilidade de se conservar este tipo de explante, visto que os embriões zigóticos imaturos apenas estão disponíveis sazonalmente.

As publicações de ES a partir de explantes de cotilédones são limitadas em coníferas. A primeira publicação onde foi induzida ES, em coníferas, usando como explantes os cotilédones, foi em *P. abies* (Lelu *et al.*, 1990b; Ruaud *et al.*, 1992). Em 1994, Lelu *et al.* usaram cotilédones derivados das plantas obtidas de embriões somáticos de *Larix x leptoeuropaea*. Nestas publicações foi demonstrado que um pré-tratamento com citoquininas pode promover a frequência de indução de ES. No entanto, a frequência de indução de ES a partir de cotilédones é reduzida.

4.1. Indução de tecido caloso

Na experiência I, foram utilizados EZM e cotilédones como explantes e realizados 3 tipos de tratamento em cada (tabela 3).

Em EZM, o melhor resultado de produção de *callus* foi em meio MS suplementado com o regulador de crescimento 2,4-D em *P. elliottii*, uma auxina bastante eficiente e por isso a mais utilizada na indução da ES (Jiménez, 2005). No entanto, foram também testados os reguladores de crescimento NAA e TDZ.

No melhor resultado de produção de *callus* foi usada a concentração de 2 mg/L de 2,4-D, pois esta é a concentração ótima na indução de ES em *Pinus* em que usam como explante EZM, de acordo com estudos realizados em *P. caribaea* (Malabadi *et al.*, 2011b); *P. wallichiana* (Malabadi *et al.*, 2007a); *P. Kesiya* (Malabadi *et al.*, 2005a); *P. roxburghii* (Malabadi *et al.*, 2007c) e *P. gerardiana* (Malabadi *et al.*, 2007d).

No caso de NAA, a concentração de 2 mg/L levou à produção de *callus*, embora inferior a 2,4-D. De acordo com Stojičić e seus colaboradores, quando NAA é

usado em vez de 2,4-D em embriões zigóticos imaturos de *P. heldreichii*, não há indução de ES (Stojičić *et al.*, 2007). Contudo, foi provado que há indução de ES quando se usa uma concentração inferior de NAA em embriões zigóticos maduros de *P. nigra* (Radojevic *et al.*, 1999).

Quando o meio foi suplementado com 0,02 mg/L de TDZ, contrariamente aos tratamentos anteriores, houve uma germinação da semente. Esta germinação foi seguida da oxidação do tecido através da acumulação de compostos fenólicos. O TDZ é uma citoquina também bastante importante na indução de ES, tendo sido utilizada com êxito na concentração de 2 mg/L de TDZ em *Cajanus cajan* (Aboshama, 2011); *Pappea capensis* (Mng'omba *et al.*, 2008) e em *Abies fraseri* (Guevin *et al.*, 1997). Contudo, não foi encontrada nenhuma publicação de indução de ES com TDZ em espécies do gênero *Pinus*.

No meio de expressão foi apenas retirado o sinal hormonal, resultando no escurecimento do *callus*. Este escurecimento pode ser evitado usando antioxidantes ou carvão ativado, como descrito por Davey (Davey *et al.*, 2010). No entanto, como referido anteriormente, o uso de antioxidantes deve ser ponderado e testado pois pode inibir a indução de ES (Pinto *et al.*, 2007)

Em cotilédones, o melhor resultado de produção de *callus* foi no híbrido em meio com 2,4-D e em meio com NAA. Em TDZ, inicialmente, não se verificou produção de *callus*. De acordo com vários autores, submeter os cotilédones a um pré-tratamento de 3 semanas com citoquininas (ex. BAP) no sentido de induzir gomos adventícios, que posteriormente são passados para meio de indução de *callus* em meio MS com 0,45 µM de BAP e 10,7 µM de NAA, pode aumentar a eficácia de indução de ES em *P. abies* (Lelu *et al.*, 1990; Ruaud *et al.*, 1992; Lelu *et al.*, 1994). No gênero *Pinus* não foi encontrada nenhuma publicação de ES em cotilédones.

Como conclusão, verificou-se maior produção de *callus* em EZM em *P. elliottii* e em cotilédones no híbrido.

Na experiência II, foram induzidos EZM do híbrido com diferentes fontes de carbono e diferentes reguladores de crescimento.

Efeito dos reguladores de crescimento

Os reguladores de crescimento escolhidos para induzir tecido caloso em EZM do híbrido foram a combinação de 2,4-D + BAP e 2,4-D + 24-epiBr. A combinação 2,4-D + BAP resultou em percentagens de produção de *callus* de cerca de 30%, sendo este de aspeto compacto e acabando por morrer devido à acumulação de compostos fenólicos. A combinação de 2,4-D + 24-epiBr resultou em percentagens mais baixas de produção de *callus* (10%), sendo este também tecido caloso não embriogénico com uma aparência compacta e de cor escura o que levou à morte do tecido devido a acumulação de compostos fenólicos. No entanto, a combinação de reguladores de crescimento 2,4-D + BAP foi usada com êxito na indução de ES de embriões zigóticos imaturos de *P. elliotii*, apesar de ter como base o meio LP (Newton *et al.*, 2005). Em *P. caribaea* e em *P. wallichiana* foi demonstrada com êxito a indução de ES em EZM quando o meio é suplementado com a combinação de reguladores de crescimento 2,4-D + 24-epiBr (Malabadi *et al.*, 2007a; Malabadi *et al.*, 2011b).

Efeito das fontes de carbono

Relativamente às fontes de carbono, comparou-se a sacarose e a maltose, e mostrou-se que não houve diferenças na produção de *callus* (T1 a T4), sendo a percentagem de indução de *callus* de 20% nas duas fontes de carbono utilizadas. No entanto, nos restantes tratamentos (T5 a T10) é apenas usada a maltose, uma vez que é a fonte de carbono mais usada com êxito em várias espécies de *Pinus*, tais como *P. kesiya*, *P. roxburghii*, *P. wallichiana*, *P. patula* e *P. sylvestris* (Aronen *et al.*, 2007; Aronen, 2009b; Malabadi *et al.*, 2003, 2004, 2005b, 2005c, 2005d, 2006, 2007, 2008a, 2008b).

De acordo com Mulgand, quando o meio foi suplementado com sacarose (20 a 40 g/L) obtiveram-se dois tipos de *callus*, embriogénico e não embriogénico, sendo o *callus* não embriogénico obtido em maiores quantidades (Mulgund *et al.*, 2012a). Em contrapartida, o uso de maltose resulta em elevadas percentagens de *callus* embriogénico branco, brilhante, friável e mucilaginoso durante a clonagem de

várias espécies de *Pinus*. Portanto, a maltose (30 g/L) revela-se a melhor fonte de carbono para a iniciação de ES em coníferas (Mulgund *et al.*, 2012a).

Efeito da temperatura

Quando os explantes foram previamente sujeitos a um choque térmico, frio e calor, os resultados obtidos demonstraram que o frio aumenta a produção de *callus*, embora este seja não embriogénico. Um estudo realizado por Malabadi e seus colaboradores demonstrou que um pré-tratamento a frio (2°C) por 3 dias, na presença de carvão ativado e de concentrações mínimas de Ca^{2+} , foi necessário para induzir tecido embrionário branco mucilaginoso derivado de brotos em ápices de *Pinus patula* maduro (Malabadi *et al.*, 2006).

Efeito de outros agentes químicos:

Os EZM foram igualmente incubados em 4 meios MS com 2,4-D + 24-EpiBr adicionando 1 mg/L de ácido salicílico, 250 mg/L de prolina, 45,3 mg/L de peróxido de hidrogénio e 2 mg/L de putrescina, respetivamente. Estes tratamentos resultaram numa elevada percentagem de produção de *callus* relativamente ao controlo 2,4-D + 24-EpiBr sem adição dos agentes referidos, contudo não se obteve tecido embriogénico.

- **Ácido salicílico (AS)**

Foi recentemente descoberto que a adição de 1 mg/L AS em meio DCR é a concentração ótima para *P. roxburghii* em termos de aumento da frequência embriogénica (Malabadi *et al.*, 2008; Malabadi *et al.*, 2011a; Mulgund *et al.*, 2012b). A utilização de elevadas concentrações de AS (2-5 mg/L) pode originar um efeito tóxico e resultar no escurecimento dos explantes sem a formação de *callus*, de acordo com o estudo realizado em *P. roxburghii*. A utilização de AS sem outros reguladores de crescimento não só reprime a indução da ES como resulta no escurecimento de explantes, mas quando combinado com 22.6 M de 2,4-D, 26.8 M de NAA e 8.9 M de BAP induz um melhoramento da percentagem de ES em *P. roxburghii* (Malabadi *et al.*, 2008; Malabadi *et al.*, 2011a; Mulgund *et al.*, 2012b). No mesmo estudo foi descoberto que AS inibe a biossíntese de etileno

(que inibe a diferenciação em plantas), promovendo o desenvolvimento do embrião (Malabadi *et al.*, 2008; Malabadi *et al.*, 2011a; Mulgund *et al.*, 2012b).

- **Prolina**

Neste estudo foi obtido tecido caloso quando o meio foi suplementado com prolina a uma concentração de 250 mg/L mas não foi obtido tecido caloso embriogénico. No entanto, em *P. nigra* e *P. caribaea* foi revelado o papel importante da prolina a uma concentração de 250 mg/L na indução de ES, reforçando a necessidade de considerar sempre os requerimentos nutricionais de cada genótipo (Radojevic *et al.*, 1999). Um estudo recente realizado em várias cultivares de *Fragaria x ananassa* revelou que a prolina (100 mg/L) é mais eficaz que outros aminoácidos (p.ex. glutamina e alanina) na indução e desenvolvimento da ES (Gerdakaneh *et al.*, 2011).

- **Peróxido de hidrogénio (H₂O₂)**

Neste trabalho obteve-se tecido caloso em meio suplementado com peróxido de hidrogénio (200 µM) em 90% dos explantes mostrando que o peróxido de hidrogénio é importante na indução de tecido caloso. No entanto, não foi obtido tecido caloso embriogénico indicando que a concentração adicionada ou a adição do peróxido de hidrogénio diretamente no meio pode interferir na viabilidade da cultura.

Contudo, estudos revelaram que a adição de peróxido de hidrogénio (200 µM) ao meio de cultura em *Lycium barbarum* promove a indução de ES, aumentando os níveis intracelulares de peróxido de hidrogénio em *callus* embriogénico. Contudo, concentrações mais elevadas podem inibir a ES (Kairong *et al.*, 2002). No entanto, não foi encontrada bibliografia da adição de peróxido de hidrogénio ao meio em espécies de *Pinus*.

- **Putrescina**

Quando adicionada putrescina ao meio, obteve-se 100% de explantes com tecido caloso. No entanto, não foi obtido tecido caloso embriogénico contrariamente a um estudo realizado por Malabadi e seus colaboradores (Malabadi *et al.*, 2007d)

que demonstrou o papel das poliaminas no processo da ES em várias espécies de coníferas, nomeadamente a sua importância em processos celulares, tais como, divisão celular, síntese proteica, replicação do DNA e resposta a stress abiótico. Neste caso em particular foi apenas estudada uma poliamina, a putrescina, demonstrando um papel positivo desta na indução de ES em *P. gerardiana*, usando como explante EZM. Neste estudo foi assinalada uma elevada percentagem de culturas embriogénicas a uma concentração de 2 mg/L de putrescina (Malabadi *et al.*, 2007d).

Para que as células recebam o estímulo necessário para adquirirem competência embriogénica é necessário que estes fatores associados a stress sejam adicionados ao meio nas etapas (ex. pré-tratamento) e concentrações ideais para que sejam eficazes.

- Outros fatores de stress

Outros fatores de stress podem ser estudados e podem contribuir para que haja produção de tecido embriogénico, tais como: choque osmótico (ex. pré-tratamento 6-12h com manitol (0,7 M)), desidratação do meio de cultura (2,5% PEG), stress hídrico (ex. secagem explantes foliares), metais pesados (ex. cádmio (300 µM)), alterações do pH do meio de cultura (ex. acidificação gradual do meio com l-galactolactona), tratamentos de choque de calor ou frio, hipóxia, antibióticos (ex. carbenicilina (125 mg/L), cefotaxima (250 mg/L) e higromicina (5-10 mg/L), radiação ultravioleta, tratamentos mecânicos ou químicos e stress oxidativo (ex. adição de ferro, cobre, menadiona ou óxido nítrico ao meio) (Yu *et al.*, 2001; Pasternak *et al.*, 2002; Ikeda-Iwai *et al.*, 2003; Aoshima, 2005; Fehér, 2005; Ötvös *et al.*, 2005; Patnaik *et al.*, 2005; Karami *et al.*, 2006; Begun *et al.*, 2007; Potters *et al.*, 2007; Lincy *et al.*, 2009).

Nesta experiência, no meio de expressão, sem reguladores de crescimento, com adição de 10 g/L de carvão ativado e redução da concentração de gelrite (para reduzir a concentração osmótica) em alguns tratamentos o *callus* existente apresentou uma aparência transparente e friável.

O uso de carvão ativado absorve substâncias inibitórias produzidas pelo meio e pelo explante (Mulgund *et al.*, 2012a), nomeadamente exsudação de compostos fenólicos (Thomas, 2008). Na indução de ES de *P. sylvestris*, foi adicionado ao meio de maturação 10 g/L de carvão ativado que exerceu um efeito benéfico na produção de embriões somáticos (Thomas, 2008). Noutra espécie, *P. pinaster*, foi observada elevada maturação de embriões somáticos quando as células foram cobertas com partículas de carvão ativado, independentemente da concentração de gelrite no meio. Isto está relacionado com a propriedade higroscópica do carvão ativado. Os embriões somáticos desenvolvem-se mais rapidamente e em maior número na presença de carvão ativado (Thomas, 2008). Também foi demonstrado que o uso de carvão ativado a 0,3% em meio DCR aumentou a taxa de sobrevivência dos explantes em *P. kesiya*, *P. roxburghii*, *P. wallichiana*, *P. patula* e *P. sylvestris* (Mulgund *et al.*, 2012a).

No meio de maturação é adicionado somente ácido abscísico (ABA) como regulador de crescimento e há um aumento da concentração de gelrite com o objetivo de retirar humidade do meio e promover o desenvolvimento de embriões somáticos. Apesar de não haver qualquer indício de tecido embriogénico consideramos importante seguir para fase do processo de ES e desta forma ganhar competências o mais alargadas possível em todas as etapas.

Está bem documentado que o uso de ABA tem um papel importante na estimulação da maturação de embriões somáticos em várias espécies de coníferas (Stasolla *et al.*, 2002, Pullman *et al.*, 2003b, Lipavska *et al.*, 2004, Aronen *et al.*, 2009a). A concentração de ABA difere das espécies para prevenir a germinação precoce. Por exemplo, em *Picea likiangensis* foi utilizada uma maior quantidade de ABA do que em *P. sylvestris* para se obter o melhor resultado (Aronen *et al.*, 2009a, Chen *et al.*, 2010).

Um dos principais problemas associado á indução de tecido caloso é a morte dos tecidos causada por escurecimento (oxidação de compostos fenólicos), e a acumulação de compostos fenólicos durante o processo de ES foi

frequentemente relatada, e alguns autores sugerem que a acumulação de compostos fenólicos pode ser uma das causas da recalcitrância (Pinto *et al.*, 2002; Alemanno, 2003; Krishna, 2007). De acordo com algumas experiências, muitos autores recomendam que na desinfecção das sementes de coníferas, estas devem ser mantidas a 4°C durante 24h em água estéril com adição de ácido ascórbico ou PVP (polivinilpirrolidona) que atuam como antioxidantes. Isto promove o fácil isolamento do embrião zigótico, mas também diminui a oxidação fenólica dos embriões inoculados no meio que origina uma quebra no processo de calogénese (Chorabik, 2012). Para além disto, poderá ser usado o carvão ativado como aditivo do meio para contrariar este efeito (Malabadi *et al.*, 2011a). Repicagens frequentes, incubação em meios líquidos com agitação, reduzir a temperatura de cultura ou o uso de explantes estiolados, também são métodos que foram usados para lidar com este problema (Krishna, 2007). Contudo, deve-se ter em mente que a aparência escura de tecido ou o surgimento de tecido necrótico pode não ser necessariamente um fator negativo. Um exemplo disso está na soja, onde foi publicado que embriões somáticos foram originados de tecidos escuros e necróticos (Ko, 2004).

CONCLUSÃO

A Biotecnologia tem conquistado a propagação *in vitro* de algumas espécies do género *Pinus*, por organogénese ou por ES. Esta estratégia de propagação traz potenciais aplicações que podem ser muito importantes para racionalizar o fornecimento dos projetos de (re) florestação, e inclusivamente integrar-se em esforços de conservação de populações ameaçadas de extinção. Por isso, a implementação de protocolos eficazes de propagação *in vitro* é um avanço tecnológico desejável, independentemente das mais-valias que no imediato se possam obter do trabalho com espécies com interesse económico.

Neste trabalho provamos que se pode obter tecido caloso a partir de material maduro de *P. elliotti*, e do híbrido *P. elliottii* x *P. caribaea*, e que esta formação de tecido caloso depende de vários fatores, nomeadamente da combinação de reguladores de crescimento e difere entre a espécie e o híbrido.

Quanto à ES, salienta-se que a ES de coníferas a partir de EZ maduros ou imaturos tornou-se numa ferramenta biotecnológica que apoia o setor florestal, proporcionando a capacidade de produção comercial (em grande escala) de plantas geneticamente melhoradas. No entanto, a clonagem de *Pinus* adultas através de ES ainda é um desafio.

Esta técnica de propagação vegetativa permite não apenas a propagação de espécies florestais individuais com características de elite, mas também ajudaria a contornar a necessidade de testes de desempenho a longo prazo, antes de iniciar a propagação em larga escala.

Assim, concluímos que parte dos objetivos foram atingidos, nomeadamente referente à formação de tecido caloso. Quanto à ES, embora os resultados obtidos não sejam os desejados, em *P. elliottii* e no híbrido, este estudo deve incentivar mais investigação fundamental para o sucesso da técnica, tais como a composição do meio e outros parâmetros necessários para estabelecer ES para estas espécies. Os resultados indicam que alguns tratamentos, nomeadamente 2 mg/l de 2,4-D, o frio e a putrescina em EZM têm resultados positivos na indução de *callus* e se otimizados em conjunto com outras situações podem revelar-se

importantes. No entanto, apesar de não ter sido o tratamento mais eficiente em termos de produção de *callus*, a adição de prolina induziu células com características muito interessantes em termos de potencial embriogénico. No entanto esta natureza embriogénica deve ser confirmada com mais estudos pois estas massas não mostraram qualquer evolução nas etapas seguintes.

Finalmente, ressalva-se, a título pessoal, que o trabalho prático desenvolvido durante estes meses permitiram a aquisição de competências nesta área por parte da autora desta dissertação de mestrado.

Este trabalho foi realizado em colaboração com uma empresa, KLÓN, pelo que a divulgação pública pode ser limitada. De qualquer forma, parte dos dados, foram alvo de uma comunicação conjunta em congresso nacional:

Abstract

Effect of different factors on the callus induction of *Pinus elliottii* and *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea*

A. Almeida¹, G. Pinto^{1*}, C. Dias¹, A. Costa¹, V. Pereira², L. Marum², S. Correia², C. Santos¹

¹Department of Biology, & CESAM – Centre for Environmental and Marine Studies, University of Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal. E-mail: ^{*}gpinto@ua.pt

²KLÓN, Innovative Technologies from Cloning, Biocant Park, Núcleo 4, Lote 4A, 3060-197 Cantanhede, Portugal

Pinus elliottii and the hybrid *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea* have significant commercial importance. Therefore it urges the need to develop a battery of *in vitro* culture protocols for micropropagation and for general research (eg, physiology, molecular biology, etc.) of these conifers. The main objective of this study was to analyze the effect of various endogenous and exogenous factors on the induction of: a) callus tissue (important in fundamental studies of physiology, maintenance of germplasm, morphogenesis, etc.); b) embryogenic callus (important for plant regeneration by somatic embryogenesis, cryopreservation studies, etc). For that, mature zygotic embryos (MZE) and cotyledons of *Pinus elliottii* and *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea* were exposed to different growth regulators (2,4-D, NAA and TDZ). First callus was visible after 15 days. The most efficient growth regulators conditions in inducing callus were: 2,4-D with 85% induction of calli in MZE; 2,4-D and NAA in cotyledons, both leading to 55% induction of calli. MZE were subjected to different growth regulators (2,4-D+24-epiBr; 2,4-D+BAP), carbon sources (sucrose and maltose) and stress factors, in particular heat (80 °C), cold (-15 °C), salicylic acid, proline, H₂O₂ and putrescine. The most efficient combination of growth regulators was 2,4-D+BAP with approximately 30% rate of calli induction. The more efficient stress conditions were cold and putrescine. These results support the possible induction of callus in these two conifers, and supports preliminary data towards the optimization of effective protocols for SE.

Effect of different factors on *callus* induction of *Pinus elliottii* and *P. elliottii* x *P. caribaea*

A. Almeida¹, G. Pinto^{1*}, C. Dias¹, A. Costa¹, V. Pereira², L. Marum², S. Correia², C. Santos¹

¹Laboratório de Biotecnologia e Sistemas, Departamento de Biologia Celular e Tissue Engineering, Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 4805-641 Aveiro, Portugal; E-mail: gopinto@ua.pt

²Unidade de Biotecnologia e Sistemas, Departamento de Biologia Celular e Tissue Engineering, Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 4805-641 Aveiro, Portugal; E-mail: gopinto@ua.pt

Introduction

Pinus elliottii (PE) and *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea* (Hybrid) have significant commercial importance. Therefore it urges the need to develop a battery of in vitro culture protocols for micropropagation and for general research (eg. physiology, molecular biology, etc.) of these conifers.

This work aims to analyse the effect of various endogenous and exogenous factors on the induction of:

- callus tissue
- embryogenic callus

Material and Methods

Experiment	Treatment	Explant	MS	Growth Regulator	Carbon Source	Callus Agent	Stress-associated factor	Notes
E1 PE and Hybrid	T1	MZE	not	2 mg/L 2,4-D	30 mg/L Sucrose	1 g/L Agar	NT	
	T2	MZE	not	2 mg/L NAA	30 mg/L Sucrose	1 g/L Agar	NT	
	T3	MZE	not	500 mg/L TZE	30 mg/L Sucrose	1 g/L Agar	NT	
	T4	MZE	not	1 mg/L 2,4-D	30 mg/L Sucrose	1 g/L Agar	NT	
	T5	MZE	not	1 mg/L 2,4-D	30 mg/L Sucrose	1 g/L Agar	NT	
E2 PE and Hybrid	T6	MZE	not	2 mg/L 2,4-D	30 mg/L Sucrose	1 g/L Agar	NT	
	T7	MZE	not	2 mg/L 2,4-D	30 mg/L Sucrose	1 g/L Agar	NT	
	T8	MZE	not	2 mg/L 2,4-D	30 mg/L Sucrose	1 g/L Agar	NT	
	T9	MZE	not	2 mg/L 2,4-D	30 mg/L Sucrose	1 g/L Agar	NT	
	T10	MZE	not	2 mg/L 2,4-D	30 mg/L Sucrose	1 g/L Agar	NT	

(MZE: mature zygotic embryo; MS: basal medium; MS: Murashige and Skoog; 2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; NAA: naphthaleneacetic acid; TZE: Thiazolidine; 24-epibrassinolide; BAP: 6-benzylaminopurine; NT: not tested; SA: salicylic acid)

Results

Experience 1

- First callus was visible after 2 weeks.
- The most efficient growth regulator condition in inducing callus were:
 - 2,4-D with 85% induction of calli in MZE;
 - 2,4-D and NAA both leading to 55% induction of calli in cotyledons.

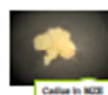
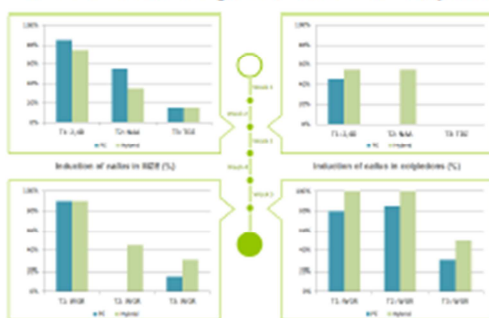


Figure 1: Callus produced by MZE in media supplemented with NAA and cotyledons in media supplemented with 2,4-D

On this experience the produced callus was highly compact and had a pearl-yellowish color in all treatments performed in MZE explants of both PE and Hybrid (Figure 1).

Experience 2

- The most efficient combination of growth regulators was 2,4-D + BAP with approximately 30% rate of calli induction.
- The stress-associated factors more efficient were cold and putrescine.

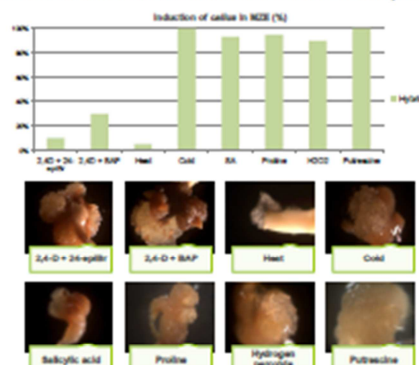


Figure 2: Callus produced by MZE in media supplemented with different growth regulator combinations (2,4-D + BAP; 2,4-D + BAP) and different stress-associated factors (heat, cold, salicylic acid, proline, hydrogen peroxide and putrescine)

- After seven weeks, the callus in these treatments was friable and had a yellowish-brownish color (Figure 2).
- When the callus is stained with acetic carmine only the nuclei are stained (red), indicating that are non embryogenic cells (Figure 3).

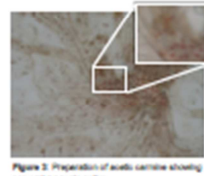


Figure 3: Preparation of acetic carmine staining of non embryogenic callus

Discussion and Conclusions

The results indicate that some treatments, in particular 2,4-D growth regulator (E1) and stress-associated factors cold and putrescine in MZE (E2) and 2,4-D and NAA in cotyledons (E1) have positive results in the induction of callus and may prove to be important data if optimized in conjunction with other situations.

These results support the possible induction of callus in these two conifers, and supports preliminary data towards the optimization of effective protocols for somatic embryogenesis.

Acknowledgments

G. Pinto is hired under the programme Ciência 2008 (FCT, Portugal), co-funded by the Human Potential Operational Programme (National Strategic Reference Framework 2007-2013) and European Social Fund (EU). FCT supported the fellowship of C. Dias (SFRH/BPD/41700/2007). This project was funded by GREN - Sistema de Incentivo à Investigação e desenvolvimento tecnológico - Project REF I&DT nº 18579.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aboshama, H. (2011). Somatic Embryogenesis Proliferation, Maturation and Germination in *Cajanus cajan*. *World Journal of Agricultural Sciences* **7** (1): 86-95
- Aderkas, P.; Coulter, A.; White, L.; Wagner, R.; Robb, J.; Rise, M.; Temmel, N.; MacEacheron, I.; Park, Y.; Bonga, J. (2005). Somatic embryogenesis via nodules in *Pinus strobus* L. and *Pinus banksiana* Lamb. - dead ends and new beginnings. *Propagation of Ornamental Plants* **5**: 3-13.
- Aitken-christie, J.; Singh, A.P.; Davis, H. (1988). Multiplication of meristematic tissue: A new tissue culture. *Genetic manipulation of woody plants*.
- Aoshima, Y. (2005). Efficient embryogenesis in the *callus* of tea (*Camellia sinensis*) enhanced by the osmotic stress or antibiotics treatment. *Plant Biotechnology*. **22** (4): 277-280.
- Aguiar, A.; Sousa, V.; Fritzsons, E.; Junior, J. (2011a) Programa de melhoramento de pinus da Embrapa Florestas. Embrapa Florestas. Colombo, PR.
- Aguiar, A.; Sousa, V.; Fritzsons, E.; Junior, J. (2011b) *Cultivo de Pínus*. Espécies de pínus mais plantadas no Brasil. Embrapa Florestas. Colombo, PR.
- Alemanno L. (2003) Localization and Identification of Phenolic Compounds in *Theobroma cacao* L. Somatic Embryogenesis. *Ann Bot* **92**: 613-623.
- Almeida, N. (2011) *Avaliação da qualidade da madeira de um híbrido de Pinus elliottii var. elliottii x Pinus caribaea var. hondurensis para produção de lâminas e manufatura de compensados*. Tese de Mestrado em Ciencias, Recursos Florestais, Tecnologia de Produtos Florestais. Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”- Universidade de São Paulo, Piraciba. 116 pp.

Apel, K. e Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373-399.

Aquea, F. e Arce-Johnson P. (2008). Identification of genes expressed during early somatic embryogenesis in *Pinus radiata*. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**: 559-68.

Aronen, T.; Ryyanen, L.; Malabadi, R. (2007) Somatic embryogenesis of Scots pine: initiation of cultures from mature tree explants and enhancement of culture system [Abstract]. In: *IUFRO Tree Biotechnology Conference*, June 3-8, 2007, Ponta Delgada, Azores, Portugal

Aronen, T.; Pehkonen, T.; Ryyänen, L. (2009a). Enhancement of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Pinus sylvestris*. *Scandinavian Journal of Forest Research* **24**: 372-83.

Aronen, T. (2009b) Initiation of somatic embryogenesis from mature scots pinesmicroscopical examination. IUFRO Tree Biotechnology, Conference, June 28th-July 2nd 2009, Whistler, BC, Canada, P-107, p 56 (abstract).

Assis, T. (2004). *Plantation Forest Biotechnology for the 21st Century*. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on Eucalyptus. Research Signpost. India.

Attree, S. e Fowke, L. (1991). Micropropagation through somatic embryogenesis in conifers, Y. P. S. Bajaj (ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol. 17. Springer-Verlag, Berlin. Pp: 53.

Attree, S. e Fowke, L. (1993). Embryogeny of Gymnosperms - Advances in Synthetic Seed Technology of Conifers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **35**: 1-35.

Becwar, M.; Nagmani, R.; Wann, S. (1990). Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Canadian Journal of Forest Research-Revue canadienne de Recherche Forestiere* **20**:810-7.

Bednarek, P.; Orlowska, R.; Koebner, R.; Zimny, J. (2007). Quantification of the tissue-culture induced variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Plant Biology* **7**: 10.

Begun, Y.; Roy, S.; Bandyopadhyay, S.; Bandyopadhyay, S.; Dasgupta, U.; Chakraborty, A. e Raychaudhuri, S. (2007). Radiation induced alterations in *Vigna radiata* during *in vitro* somatic embryogenesis. *International Journal of Radiation Biology*. **84** (2): 165-175.

Bingre, P. (2007). Guia de Campo- As árvores e os arbustos de Portugal continental. 462 pp. Jornal Público/ Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento/ Liga para a Protecção da Natureza. Lisboa. 9 vols.

Bomal, C.; Le, V.; Tremblay, F. (2002). Induction of tolerance to fast desiccation in black spruce (*Picea mariana*) somatic embryos: relationship between partial water loss, sugars, and dehydrins. *Physiologia Plantarum* **115**: 523-30.

Bonga, J. e Aderkas, P. (1992) *In vitro* culture of trees. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 236 pp.

Bonga, J. (1997). The effect of collection date and frozen storage on the formation of embryo-like structures and elongating shoots from explants from mature *Larix decidua* and *L. x eurolepis*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* **51**: 195-200.

Bonga, J.; Klimaszewska, K.; Aderkas, P. (2009). Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* **100**: 241–254

Bozhkov, P. e Arnold, S. (1998). Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. *Physiologia Plantarum* **104**: 211-24.

Breton, C.; Cornu, D.; Chriqui, D.; Sauvanet, A.; Capelli, P.; Germain, E.; Jay-Allemand, C. (2004). Somatic embryogenesis, micropropagation and plant regeneration of "Early Mature" walnut trees (*Juglans regia*) that flower *in vitro*. *Tree physiology*. **24**: 425-35.

Blanc, G.; Lardet, L.; Martin, A.; Jacob, J.; Carron, M. (2002). Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic *callus* of *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.). *Journal of Experimental Botany*. **53**: 1453-1462.

CABI (2002). Pines of Silvicultural Importance. CABI Publishing. USA.

Chalupa, V. (1985). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *Comm. inst. Forest Czech*. **14**: 57-63.

Chavez, A. (2011). Initiation of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of Oocarpa pine (*Pinus oocarpa* Schiede ex Schlechtendal). *Tree Physiology*. **31**: 539–554

Che, P.; Love, T.; Frame, B.; Wang, K.; Carriquiry, A.; Howell, H. (2006). Gene expression patterns during somatic embryo development and germination in maize Hi II *callus* cultures. *Plant Molecular Biology* **62**: 1-14

Cheliak, W. e Klimaszewska, K. (1991). Genetic variation in somatic embryogenic response in open-pollinated families of black spruce. *Theor. Appl. Genet.* **82**: 185-190.

Chen, S.; Chen, F.; Wu, T.; Wang, Y.; Yi, S. (2010). Somatic embryogenesis in mature zygotic embryos of *Picea likiangensis*. *Biologia* **65**: 853-8.

Chorabik, K. (2012). *Embryogenesis*. Somatic Embryogenesis in Forest Plants. Dr. KenIchiSato (Ed.).

Chugh, A. e Khurana, P. (2002). Gene expression during somatic embryogenesis – recent advances. *Current Science* **83** (6): 715-739.

Davey, M. e Anthony, P. (2010). *Plant Cell Culture: Essential Methods*. Wiley-Blackwell Publishers. UK.

Deo, C.; Tyagi¹, A.; Taylor, M.; Harding, R.; Becker, D. (2010). Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*. **28** (1): 27-40.

Durzan, D. e Chalupa, V. (1976). Growth and metabolism of cells and tissue of Jack pine (*Pinus banksiana*). 3. Growth of cells in liquid suspension cultures in light and darkness. *Canadian Journal of Botany Revue Canadienne de Botanique* **54**: 456-67.

Elesbão, L. (2011). Performance do *Pinus elliottii* Engelm. e *Pinus taeda* L. em áreas arenizadas e degradadas no oeste do Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado em Engenharia Florestal. Centro de Ciências Rurais - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. 165 pp.

Farjon, A. (1984). *Pines*. E. J. Brill, Leiden.

Fehér, A.; Pasternak T.; Otvos, K.; Miskolczi, P.; Dudits, D. (2002). Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. *Biologia*. **57**: 5-12.

Fehér, A.; Pasternak T.; Dudits, D. (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. **74**: 201-228.

Fehér, A. (2005). Why somatic plant cells start to form embryos? Em: Mujid, A. e Samaj, J. eds. *Somatic Embryogenesis. Plant Cell Monographs*. **2**: 85-101.

Finkelstein, R. e Gibson, S. (2001). ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd?. *Current Opinion in Plant Biology*. **5**: 26-32.

Gaj M. (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulat.* **43**: 27-47

Garin, E.; Isabel, N.; Plourde, A. (1998). Screening of large numbers of seed families of *Pinus strobus* L. for somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos. *Plant Cell Reports* **18**: 37-43.

Garin, E.; Bernier-Cardou, M.; Isabel, N.; Klimaszewska, K.; Plourde, A. (2000). Effect of sugars, amino acids, and culture technique on maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* on medium with two gellan gum concentrations. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **62**: 27-37.

Gautheret, R. (1983). Plant tissue culture - a history. *Botanical Magazine-Tokyo* **96**: 393-410.

George, E.; Hall, M.; Klerk, G. (2008a). Plant Propagation by Tissue Culture. Chapter 2: Micropropagation: uses and methods. 3rd edition. Springer. Netherlands.

George, E.; Hall, M.; Klerk, G. (2008b). Plant Propagation by Tissue Culture. Chapter 4: The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. 3rd edition. Springer. Netherlands.

Gerdakaneh, M.; Mozafari, A.; Sioseh-mardah, A.; Sarabi, B. (2011). Effects of different amino acids on somatic embryogenesis of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Acta Physiol Plant.* **33**: 1847-1852.

Grotkopp, E.; Rejmánek, M.; Sanderson, M.; Rost, T. (2004). Evolution of genome size in pines (*Pinus*) and its life-history correlates: supertree analyses. *Evolution.* **58** (8):1705-29.

Guerra, M.; Torres, A.; Teixeira, J. (1999) Embriogénese Somática e Sementes Sintéticas. *Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.* **2**: 533-568.

Guevin, T. e Kirby, E. (1997). Induction of embryogenesis in cultured mature zygotic embryos of *Abies fraseri* (Pursh) Poir. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **49**: 219–222.

Gupta, P. e Durzan, D. (1986). Plantlet regeneration via somatic embryogenesis from subcultured *callus* of mature embryos of *Picea abies* (Norway spruce) *in vitro*. *Cell Develop. Biol.* **22**: 685-688.

Häggman, H.; Jokela, A.; Krajnakova, J.; Kauppi, A.; Niemi, K.; Aronen, T. (1999). Somatic embryogenesis of Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1769-78.

Hakman, I.; Fowke, L.; Arnold, S.; Eriksson, T. (1985). The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *Plant Science* **38**: 53-9.

Hazarika, B. (2006) Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Sci*

Hortic **108**: 105- 120.

Hargreaves, C.; Reeves, C.; Find, J.; Gough, K.; Josekutty, P.; Skudder, D.; Van Der Maas, S; Sigley, M.; Menzies, M.; Low, C.; Mullin, T. (2009). Improving initiation, genotype capture and family representation in somatic embryogenesis of *Pinus radiata* by a combination of zygotic embryo maturity, media and explants preparation. *Can. J. For. Res.* **39**: 1566-1574.

Helmersson, A. e Arnold, S. (2009). Embryogenic cell lines of *Juniperus communis*; easy establishment and embryo maturation, limited germination. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **96**: 211-217.

Henry, R. (1998). Molecular and biochemical characterization of somaclonal variation, in SM Jain, DS Brar and BS Ahloowalia (eds), Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Germany pp. 485-499.

Hosoi, Y. (2012). Plant regeneration from embryogenic tissue of *Pinus luchuensis* Mayr, an endemic species in Ryukyu Island, Japan. *Plant Biotechnology.* **29**: 401–406.

Humánez (2012). Somatic embryogenesis from different tissues of Spanish populations of maritime pine. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* **111**: 373–383.

Iraqi, D. e Tremblay, F. (2001). The role of sucrose during maturation of black spruce (*Picea mariana*) and white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *Physiologia Plantarum*, **111**: 381-388.

Ikeda-Iwai, M.; Umehara, M.; Satoh, S.; Kamada, H. (2003) Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal.* **34** (1): 107-114.

Jain, S.; Dong, N.; Newton, R. (1989). Somatic embryogenesis in slash pine (*Pinus elliottii*) from immature embryos cultured in vitro. *Plant Science*. **65**: 233-241.

Jain, S. (2012) Date palm biotechnology: Current status and prospective - an overview. *Emir. J. Food Agric*. **24** (5): 386-399.

Jiménez, V. (2001) Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *R. Bras. Fisiol. Veg.* **13** (2): 196-223.

Jiménez, V. (2005). Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*. **47**: 91-110.

Jones, N. (2002). Somatic embryogenesis as a tool to capture genetic gain from tree breeding strategies; risks and benefits; creating new germplasm. *Southern African Forestry Journal*. **195**: 93-102.

Kaeppler, S.; Kaeppler, H; Rhee, Y. (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol Biol* **43**: 179–188

Kairong, C.; Gengsheng, X.; Xinmin, L.; Gengmei, X.; Yafu, W. (2002). Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. *Plant science*. **146**: 9-16.

Kamada, H.; Ishikawa, K.; Saga, H.; Harada, H. (1993) Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. *Plant Tissue Culture Letters*. **10** (1): 38-44.

Karami, O.; Deljou, A.; Esna-Ashari, M.; Ostad-Ahmdi, P. (2006). Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Scientia Horticulturae*, **110** (4): 340-344.

Kaul, K. e Kochhar, T. (1985). Growth and differentiation of *callus* cultures of *Pinus*. *Plant Cell Rep.* **4**: 180-183.

Keinonen-Mettälä, K.; Jalonen, P.; Eurola, P.; VonArnold, S.; VonWeissenberg, K. (1996). Somatic embryogenesis of *Pinus sylvestris*. *Scandinavian Journal of Forest Research* **11**: 242-50.

Klerk, G. (1990) How to measure somaclonal variation: a review. *Acta Bot Neerl* **39**: 129-144

Klimaszewska, K. 1989. Plantlet development from immature zygotic embryos of hybrid larch through somatic embryogenesis. *Plant Sci*, **63**: 95-103.

Klimaszewska, K. e Smith, D. (1997) Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum. *Physiol. Plant.* **100**: 949-957

Klimaszewska, K.; Park Y.; Overton, C.; MacEacheron, I.; Bonga J. (2001). Optimized somatic embryogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* **37**: 231-239.

Klimaszewska, K. e Cyr, D. (2002). Conifer somatic embryogenesis: I. Development. *Dendrobiol* **48**: 31-9.

Klimaszewska, K.; Trontin J.; Becwar M.; Devillard C.; Park Y.; Lelu-Walter M. (2007). Recent progress in somatic embryogenesis of four *Pinus* spp. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*. **1** (1): 11-25.

Ko, T. (2004). Screening Multiple Soybean Cultivars (MG 00 to MG VIII) for Somatic Embryogenesis Following *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Immature Cotyledons. *Crop Sci.* **44**: 1825–1831.

Kowalski, T. e Kehr, R. (1992). Endophytic fungal colonization of branch bases in several forest tree species. *Sydowia*, **44**: 137-168.

Krishna, H (2007). Biotechnological advances in mango (*Mangifera indica* L.) and their future implication in crop improvement — A review. *Biotechnology Advances* **25**: 223–243.

Kvaalen, H. e Appelgren, M. (1999). Light quality influences germination, root growth and hypocotyl elongation in somatic embryos but not in seedlings of Norway spruce. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **35**: 437-41.

Lelu, M. e Bornman, C. (1990a). Induction of somatic embryogenesis in excised cotyledons of *Picea glauca* and *Picea mariana*. *Plant Physiology and Biochemistry* **28**: 785-91.

Lelu, M.; Boulay, M.; Bornman, C. (1990b) Somatic embryogenesis in cotyledons of *Picea abies* is enhanced by an adventitious bud-inducing treatment. *New Forests* **4**: 125-35.

Lelu, M.; Klimaszewska, K.; Charest, P. (1994) Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix*. *Canadian Journal of Forest Research* **24**: 100-106.

Lelu, M.; Bastien, C.; Drugeault, A.; Gouez, M.; Klimaszewska, K. (1999). Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators. *Physiologia Plantarum* **105**: 719-28.

Le Roux, J. e Van Staden, J. (1991). Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus*—a review. *Tree Physiol* **9** (4): 435-477

Leo, P. e Shee, J. (2003), Sugar and hormone connections, *Trends In Plant Science*, **8**, 110-116.

Li, X. (1998). Polyethylene glycol and maltose enhance somatic embryo maturation in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *In Vitro Cell. Dev. Plant.* **34**: 22-26.

Liao, Y. (1993). *In vitro* propagation of slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.). Ph.D. Thesis, North Carolina State University, 151 pp.

Liao, Y. (1995). Slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.) somatic embryogenesis I. Initiation of embryogenic cultures from immature zygotic embryos. *New Forests.* **10**: 145-163.

Lincy, A.; Remashree, A.; Sasikumar, B. (2009). Indirect and direct somatic embryogenesis from aerial stem explants of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Acta Botanica Croatica.* **68** (1): 93-103.

Lipavská, H.; Svobodová, H.; Albrechtová J.; Kumstýrová L.; Vágner M.; Vondráková Z. (2000) Carbohydrate status during somatic embryo maturation in Norway spruce, *In vitro Cellular and Development Biology – Plant*, **36**, 260-267.

Lipavska, H. e Konradova, H. (2004). Somatic embryogenesis in conifers: The role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **40**: 23-30.

Loureiro, J.; Pinto, G.; Lopes, T.; Dolezel, J.; Santos, C. (2005). Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry. *Planta* **221**: 815–822.

Malabadi, R.; Staten, J. (2003) Somatic embryos can be induced from shoot apical domes of mature *Pinus patula* trees. *South African Journal of Botany.* **69**: 450-451.

Malabadi, R.; Choudhury, H.; Tandon, P. (2004). Initiation, maintenance and maturation of somatic embryos from thin apical dome sections in *Pinus kesiya*

(Royle ex. Gord) promoted by partial desiccation and Gellan gum. *Scientia Horticulturae* **102**: 449-59.

Malabadi, R.; Gangadhar, M.; Nataraja, K. (2005a). Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Pinus kesiya* (Royle ex. Gord.) influenced by triacontanol. *Acta Physiologiae Plantarum*. **27**: 531-537.

Malabadi, R.; Vijaya, S.; Mulgund, G. (2005b). Role of antioxidants and amino acids on somatic embryogenesis of *Pinus patula*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. **41**: 181-186.

Malabadi, R. e Staden J. (2005c). Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula*. *Tree Physiology* **25**: 11-6.

Malabadi, R. e Staden, J. (2005d) Storability and germination of sodium alginate encapsulated somatic embryos derived from the vegetative shoot apices of mature *Pinus patula* trees. *Plant Cell Tissue Organ and Culture*. **82**: 259-265.

Malabadi, R. e Staden, J. (2006). Cold-enhanced induction and maturation of somatic embryos from intact megagametophyte explants in *Pinus patula* is mediated by calcium. *South African Journal of Botany*. **72** (4): 613-618.

Malabadi, R. e Nataraja, K. (2007a). 24-epiBrassinolide induces somatic embryogenesis in *Pinus wallichiana* A. B. Jacks. *Journal of Plant Sciences*. **2** (2): 171-178.

Malabadi, R. e Nataraja, K. (2007b). Plant regeneration via somatic embryogenesis using secondary needles of mature trees of *Pinus roxburghii* Sarg. *International Journal of Botany*, **3** (1): 40-47.

Malabadi, R. e Nataraja, K. (2007c). Influence of Triacontanol on Somatic Embryogenesis of *Pinus roxburghii* Sarg. *Baltic Forestry*. **13** (1): 39-44.

Malabadi, R. e Nataraja, K. (2007d). Putrescine influences somatic embryogenesis and plant regeneration in *Pinus gerardiana* Wall. *American Journal of Plant Physiology*. **2** (2): 107-114.

Malabadi, R. e Nataraja, K. (2007e). Smoke-saturated water influences somatic embryogenesis using vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus wallichiana* A.B. Jacks. *Journal of Plant Science* **2** (1): 45-53.

Malabadi, R.; Teixeira, J.; Nataraja, K. (2008a). A new approach involving salicylic acid and thin cell layers for cloning mature trees of *Pinus roxburghii* (chir pine). *The American Journal of Plant Science and Biotechnology*. **2** (2): 56-59.

Malabadi, R.; Teixeira da Silva, J.; Nataraja, K. (2008b) Salicylic acid induces somatic embryogenesis from mature trees of *Pinus roxburghii* (Chir pine) using TCL Technology. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*. **2** (1): 34-39.

Malabadi, R.; Teixeira, J.; Nataraja, K.; Kumar, S.; Mulgund, G. (2011a). Induction of somatic embryogenesis in mature coniferous forest trees. *Research in Biotechnology*. **2** (5): 8-33.

Malabadi, R.; Teixeira, J.; Mulgund, G. (2011b). Induction of somatic embryogenesis in *Pinus caribaea*. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*. **5** (1): 27-32.

Marek-Swize, K. (1994). Somatic embryogenesis, maturation and DNA transfer in *Pinus*. M.S. Thesis. Texas A&M University, 45 pp.

Marques, H. (2012). Regiões de proveniência Portugal. Projeto – DEFOR. Autoridade Florestal Nacional

Maruyama, E.; Hosoi, Y.; Ishii, K. (2005). Propagation of Japanese red pine (*Pinus densiflora* Zieb. et Zucc.) via somatic embryogenesis. *Propagation of Ornamental Plants* **5**: 199-204.

Marum, L.; Loureiro, J.; Rodriguez, E.; Santos, C.; Oliveira, M.; Miguel, C. (2009). Flow cytometric and morphological analyses of *Pinus pinaster* somatic embryogenesis. *Journal of Biotechnology*. **143** (4): 288-295.

McCown B. (2000). Recalcitrance of woody and herbaceous perennial plants: dealing with genetic predeterminism. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* **36**:149–154.

Merkle, S.; Parrott, W.; Flinn, B. (1995). Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: *In vitro embryogenesis in plants*, T.A. Thorpe, (Ed.), 155–203, Kluwer Academic, ISBN 0-7923-3149-4, Dordrecht, Netherlands

Merkle, S.; Montello, P.; Xia, X.; Upchurch, B.; Smith, D. (2006). Light quality treatments enhance somatic seedling production in three southern pine species. *Tree Physiology* **26**: 187-94.

Miguel, C.; Gonçalves, S.; Tereso, S.; Marum, L.; Maroco, J.; Oliveira, M. (2004). Somatic embryogenesis from 20 open-pollinated families of Portuguese plus trees of maritime pine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **76**: 121–130.

Mirov, T. (1967). *The Genus Pinus*. Ronald Press, New York

Mng'omba, S.; Toit, E.; Akinnifesi, F. (2008). Plant regeneration through somatic embryogenesis of jacket plum (*Pappea capensis*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, **36**: 137-144.

Montalbán, I. (2010). Bottlenecks in *Pinus radiata* somatic embryogenesis: improving maturation and germination. *Trees*. **24**: 1061-1071.

Morse, A.; Peterson, D.; Islam-Faridi, M.; Smith, K.; Magbanua, Z.; Garcia, S.; Kubisiak, T.; Amerson, H.; Carlson, J. e Nelson, C. (2009) Evolution of genome size and complexity in Pinus. *PLoS ONE* **4**: e4332

Mulgund, G.; Meti, N.; Malabadi, R.; Nataraja, K. e Kumar, S. (2012a). Factors influencing cloning mature trees of conifers. *Research in Plant Biology*, **2** (2): 38-42.

Mulgund, G.; Meti, N.; Malabadi, R.; Nataraja, K.; Kumar, S. (2012b). Role of salicylic acid on conifer somatic embryogenesis. *Research in Biotechnology*, **3** (2): 57-61.

Murashige, T. e Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497.

Namasivayam, P. (2007) Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **90**: 1-8.

Naturlink (2009). Ficha do Pinheiro-Manso. Acedido em 8 de Abril de 2013 em <http://naturlink.sapo.pt/article.aspx?menuid=55&cid=3681&bl=1&viewall=true>.

Nehra, S.; Becwar, M.; Rottmann, W.; Pearson, L.; Chowdhury, K.; Chang, S.; Wilde, D.; Kodrzycki, R.; Zhang, C.; Gause, K.; Parks, D.; Hinchey, M. (2005). Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **41**: 701-717.

Newton, R.; Dong, N.; Marek-Swize, K.; Cairney, J. (1993). Transformation of slash pine. Proceedings of 22nd. SFTIC. 390-402. Atlanta, Georgia.

Newton, R.; Marek-Swize, K.; Magallanes-Cedeno, M.; Dong, N.; Sen, S.; Jain, S. (1995). Somatic embryogenesis in slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.). *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. **44-46**: 183-195

Newton, R.; Tang, W.; Jain, S. (2005). Slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.). *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, **1**: 10.

Niemi, K.; Sarjala, T.; Chen, X.; Haggman, H. (2002). Spermidine and methylglyoxal bis (guanylhydrazone) affect maturation and endogenous polyamine content of Scots pine embryogenic cultures. *Journal of Plant Physiology* **159**: 1155-8.

Niemi, K.; Sarjala, T.; Chen, X.; Häggman, H. (2007). Spermidine and the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* synergistically induce maturation of Scots pine embryogenic cultures. *Journal of Plant Physiology* **164**: 629-35.

Noceda, C.; Salaj, T.; Perez, M.; Viejo, M.; Jesus Canal, M.; Salaj, J.; Rodriguez, R. (2009). DNA demethylation and decrease on free polyamines is associated with the embryogenic capacity of *Pinus nigra* Arn. cell culture. *Trees Structure and Function* **23**: 1285-93.

Ötvös, K.; Pasternak, T.; Miskolczi, P.; Domoki, M.; Dorjgotov, D.; Szûcs, A.; Bottka, S.; Dudits, D.; Fehér, A. (2005) Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *Plant J* **43**: 849–860

Orchard, A. (1998). *Flora of Australia*. **48**: 589–585.

Ozkurt, Z. (2006). Induction of embryogenic tissue from immature zygotic embryos in *Pinus nigra* subspecies *pallasiana* Lamb. The Degree of Master of Sciences of Biology. The Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University. 83 pp.

Park, Y.; Barrett, J.; Bonga, J. (1998) Applications of somatic embryogenesis in highvalue

clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **34**:231-239

Park, Y. (2002). Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Annals of Forest Science* **59**: 651-6.

Park, Y.; Lelu-Walter, M.; Harvengt, L.; Trontin, J.; MacEacheron, I.; Klimaszewska, K.; Bonga, J. (2006). Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **86**: 87-101.

Pasternak, P.; Prinsen, E.; Ayaydin, F.; Miskolczi, P.; Potters, G.; Asard, H.; Vanonckelen, H.; Dudits, D.; Fehér, A. (2002) The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast derived cells of alfalfa. *Plant Physiology*. **129** (4): 1807-1819.

Patnaik, D.; Mahalakshmi, A.; Khurana, P. (2005). Effect of water stress and heavy metals on induction of somatic embryogenesis in wheat leaf base cultures. *Indian Journal of Experimental Biology* **43** (8): 740-745.

Percy, R.; Klimaszewska, K.; Cyr, D. (2000). Evaluation of somatic embryogenesis for clonal propagation of western white pine. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* **30**: 1867-76.

Phillips G (2004) *In vitro* morphogenesis in plants- recent advances. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **40**:342-345

Pijut, P.; Lawson, S.; Michler, C. (2011). Biotechnological efforts for preserving and enhancing temperate hardwood tree biodiversity, health, and productivity. *In Vitro Cell.Dev.Biol. Plant*.

Pinto G.; Santos, C.; Neves, L.; Araújo, C. (2002) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Cell Rep* **21**: 208-213.

Pinto, G.; Loureiro, J.; Lopes, T.; Santos, C. (2004). Analysis of the genetic stability of *Eucalyptus globulus* Labill. somatic embryos by flow cytometry. *Theoret. Appl. Genet.* **109**: 580–587.

Pinto, G.; Silva, S.; Araújo, C.; Neves, L.; Park, Y.; Santos, C. (2007) Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.: basal medium and antioxidants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*

Pinto, G.; Park, Y.; Neves, L.; Araujo, C.; Santos, C. (2008) Genetic control of somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Cell Rep* **27**: 1093–1101.

Pinto, G.; Park, Y.; Loureiro, J.; Neves, L.; Araujo, C.; Silva, S.; Santos, C. (2009). Somatic Embryogenesis in *Eucalyptus* — An Update to 2009. *Applications of Plant Biotechnology*

PINUS BRASIL (2007). Pinus Brasil Agro Florestal LTDA. Acedido em 3 de Agosto de 2013 em <http://www.pinusbrasil.com.br>

Pospisilova, J.; Ticha, I.; Kadlec, P.; Haisel, D.; Plzakova, S. (1999) Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. *Biol Plant* **42** (4):481- 497

Potters, G.; Pasternak, T.; Guisez, Y.; Palme, K.; Jansen, M. (2007). Strees-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science.* **12** (3): 98-105.

Premkumar, A.; Mercado, J.; Quesada, M. (2001) Effects of *in vitro* tissue culture conditions and acclimatization on the contents of Rubisco, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments, and C/N ratio. *J Plant Physiol* **158**: 835–840.

Pullman, G.; Namjoshi, K.; Zhang, Y. (2003a). Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): improving culture initiation with abscisic acid and silver nitrate. *Plant Cell Reports* **22**: 85-95.

Pullman, G.; Johnson, S.; Peter, G.; Cairney, J.; Xu, N. (2003b). Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression. *Plant Cell Reports* **21**: 747-58.

Pullman, G.; Johnson, S.; Van Tassel, S.; Zhang, Y. (2004). Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda*) and Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*): improving culture initiation and growth with MES PH buffer, biotin, and folic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **80**: 91-103.

Pullman, G.; Chopra, R.; Chase, K. (2006). Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) somatic embryogenesis: improvements in embryogenic tissue initiation by supplementation of medium with organic acids, Vitamins B₁₂ and E. *Plant science*. **170**: 648-658.

Pullman, G. e Buchanan, M. (2008). Identification and quantitative analysis of stage-specific carbohydrates in loblolly pine (*Pinus taeda*) zygotic embryo and female gametophyte tissues. *Tree Physiology* **28**: 985-96.

Pullman, G.; Chase, K.; Skryabina, A.; Bucalo, K. (2009). Conifer embryogenic tissue initiation: improvements by supplementation of medium with D-xylose and D-chiro-inositol. *Tree Physiology* **29**: 147-56.

Radojevic, L.; Álvarez, C.; Fraga, M.; Rodríguez, R. (1999). Somatic embryogenic tissue establishment from mature *Pinus nigra* arn. ssp. *Salzmannii* embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. **35**: 206-209.

Ramage, C. e Williams, R. (2002). Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* **38**: 116-124.

Ramarosandratana, A., Harvent, L. Bouvet, A. Calvayrac, R.; Pâques, M. (2001). Effects of carbohydrate source, polyethylene glycol and gellan gum concentration on embryonal-suspensor mass (ESM) proliferation and maturation of maritime pine somatic embryos.

In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant **37**:29–34

Richardson, M. (1998). *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge. 530 p.

Ruaud, J.; Bercetche, J.; Paques, M. (1992) First evidence of somatic embryogenesis from needles of 1-year-old *Picea abies* plants. *Plant Cell Reports*, **11**: 563-566.

Salajova, T. (2005). Protocol of somatic embryogenesis of *Pinus nigra* ARN. *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Springer. Netherlands.

Santacruz-Ruvalcaba F. (1998). Somatic embryogenesis in some cactus and agave species, *Professional Association for Cactus Development Journal* **3**: 15–26.

Scherer, P.; Muller, E.; Lippert, H.; Wolff, G. (1988) Multielement analysis and Gelrite impurities investigated by inductively coupled plasma emission spectrometry as well as physical properties of tissue culture media prepared with agar or the gellan gum Gelrite. *Acta Hort.* **226**: 655-658

Shimizu, J. e Spir, I. (1999). Seleção de *Pinus elliottii* pelo valor genético para alta produção de resina. *Boletim de Pesquisa Florestal*, Colombo, n. 38, p. 103-117.

Shin, H. (2012). Somatic embryogenesis of *Pinus rigida* x *P. taeda* and the relationship between the initiation of embryogenic tissue and zygotic embryo development. *Plant Biotechnol. Rep.* **6**: 175-181.

Silveira V, Floh E., Handro W, Guerra M. (2004). Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **76**: 53-60.

Smith, D. (1994). Growth medium for plant embryogenic tissue. Australia/Canada Patent # PM5232.

Smulders M.; Esselink, D.; Voorrips, R.; Vosman, B. (2005) Analysis of a database of DNA profiles of 734 hybrid tea rose (*Rosa hybrida*) varieties. UPOV Document BMT/9/12.

Smulders, M. e Klerk, G. (2011) Epigenetics in plant tissue culture. *Epigenetics in plant tissue culture* **63**: 137-146.

Stasolla, C.; Kong, L.; Yeung, E.; Thorpe, T. (2002). Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **38**: 93-105.

Stasolla, C. e Yeung, E. (2003). Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **74**: 15-35.

Steiner, C.; Long, Z.; Krumins, J.; Morin, P. (2005) Temporal stability of aquatic food webs: partitioning the effects of species diversity, species composition and enrichment. *Ecol. Lett.* **8**: 819–828.

Steward, F. (1958). Growth and development of cultivated cells. III. Interpretations of growth from free cell of carrot. *American Journal of Botany*. **45**: 709-713.

Stojičić, D.; Uzelac, B.; Janošević, D.; Culafić, L.; Budimir, S. (2007). Induction of somatic embryogenesis in *Pinus heldreichii* culture. *Arch. Biol. Sci.* **59** (3): 199-202.

Surendran, C.; Parthiban, K.; Vanangamudi, K.; Balaji, S. (2000). Vegetative Propagation of Trees, Principles and Practices.1-154, TNAU press, Coimbatore-03.

Szczygiel, K.; Przybyl, T.; Bojarkzuk, K. (2007). Somatic embryogenesis of selected coniferous tree species of the genera *Picea*, *Abies* and *Larix*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **76** (1): 7-15

Tang, W. e Fan, O. (1997). Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in slash pine. *Plant Res. Environ.* **6** (2): 8-11.

Tang, W.; Zhongchen, G.; Fan, O. (2001). Plant regeneration from embryogenic cultures initiated from mature loblolly pine zygotic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* **37**: 558-563.

Tang W, Newton RJ, Charles T (2006). Plant regeneration through multiple adventitious shoot differentiation from *callus* cultures of slash pine (*Pinus elliottii*). *J. Plant Physiol.* **16**: 98-101.

Tautorus, T.; Fowke, L.; Dunstan, D. (1991). Somatic embryogenesis in conifers, *Can. J. Bot.*, **69**: 1873-99.

Thomas, T. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances.* **26**: 618-631.

Thorpe, T. (1995). *In vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.

Tolga, Y. (2005). Induction of embryogenic tissue and development of somatic embryos in *Pinus brutia* ten. The Degree of Doctor of Philosophy in Biology. Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University. 102 pp.

Tremblay, L. e Tremblay, E. (1991). Effects of gelling agents, ammonium nitrate, and light on the development of *Picea mariana* (Mill.) B. S. P. (black spruce) and *Picea rubens* Sarg. (red spruce) somatic embryos. *Plant Sci.* **77**: 233-242.

Trigiano, R. (2011). Plant development and biotechnology. Section IV Propagation and development concepts. CRC PRESS.

Valluri, J.V., W.J. Treat, R.J. Newton, B.G. Cobb and E.J. Soltes. 1988. Protein synthesis in slash pine *callus* cultures exposed to water stress. *Tree Physiol.* **4**: 181-186

Vicient, C. e Martínez, F. (1998). The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal.* **10 (1)**: 1-12.

Von, A. e Bonga, J. (2000). Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiol* **20**: 921–928.

Walter, C. (2005). Somatic embryogenesis and genetic transformation in *Pinus radiata*. *Protocol for Somatic Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Springer. Netherlands.

Yang, X. e Zhang, X. (2010). Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*. **29**: 36-57.

Yu, T.; Yeh, S.; Yang, J. (2001). Effects of carbenicillin and cefotaxime on *callus* growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, **42** (4): 281-286.

Zavattieri, M.; Frederico, A.; Lima, M.; Sabino, R.; Schmitt, B. (2010). Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology*. **13** (1).

Zeng, F.; Zhang, X.; Cheng, L.; Hu, L.; Zhu, L.; Cao, J.; Guo, X. (2007) A draft gene regulatory network for cellular totipotency reprogramming during plant somatic embryogenesis. *Genomics*. **90** (5): 620-628.

Zhang, C. (2007). Induction, development and maturation of somatic embryos in Bunge's pine (*Pinus bungeana* Zucc. ex Endl.). *Plant Cell Tiss Organ Cult*. **91**: 273–280.